

**Zur Primärstruktur der
Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
aus Kaninchenmuskel:
Isolierung und Sequenzierung des
größten Bromcyanfragmentes**

Irmgard G. Assfalg

1976

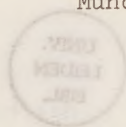


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551910_0048

Zur Primärstruktur der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
aus Kaninchenmuskel:
Isolierung und Sequenzierung des
größten Bromcyanfragmentes

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt von
Irmgard G. Assfalg
geboren in Tettnang

München 1976



Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher

Prof. Dr. Fritz Eiden

Tag der Einreichung der Arbeit: 26. 5. 1976

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 7. 1976

Diese Arbeit entstand unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher
von Januar 1972 bis April 1976 am Institut für
Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und
Zellbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher danke ich sehr
für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die groß-
zügige Förderung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Fritz Eiden danke ich für sein Interesse
und die Übernahme der Arbeit.

Besonders herzlich danke ich
Herrn Dr. Joachim Otto und Herrn P.D. Dr. Werner Machleidt
für die Anregung, laufende Betreuung und Unterstützung
meiner Arbeit; Herrn Dr. Elmar Wachter danke ich für
seine experimentelle Hilfe.

Die interessierte und zuverlässige Mitarbeit von Frau
Gerda Behrens, Frl. Hanna Kummer, Herrn Josef Zach und
Frl. Gabi Schneider verdient meinen herzlichsten Dank;
Herrn Ing. Helmut Hofner und der Werkstatt des Instituts
danke ich für die souveräne Lösung der technischen
Probleme.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A.	Einleitung	1
B.	Ergebnisse	
B.1.	Modifizierung und Spaltung der der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel	5
B.1.1.	Reinheit der GDH	5
B.1.2.	Modifizierung der Cysteine	5
B.1.3.	Bromcyanspaltung	6
B.1.4.	Auftrennung der Bromcyanpeptide	6
B.2.	Bestimmung der Aminosäuresequenz des Bromcyanpeptids B I	12
B.2.1.	Sequenzierung des ungespaltenen B I mit dem Solid-Phase-Edman-Abbau	12
B.2.2.	Tryptische Peptide von B I	18
B.2.2.1.	Primäre analytische Charakterisierung der tryptischen Peptide von B I	18
B.2.2.2.	Sequenzierung des C-terminalen Homoserin- peptids	20
B.2.2.3.	Isolierung der tryptischen Peptide von B I	24
B.2.2.4.	Sequenzierung der tryptischen Peptide	30
B.2.2.4.1.	Sequenzierung mit der Solid-Phase-Methode	30
B.2.2.4.2.	Sequenzierung mit der Dansyl-Edman- Technik	33
B.2.3.	Überlappung der tryptischen Peptide	37
B.2.3.1.	Chymotryptische Peptide	37
B.2.3.2.	Peptide durch Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease	44
B.2.3.3.	Reihenfolge der tryptischen Peptide	46

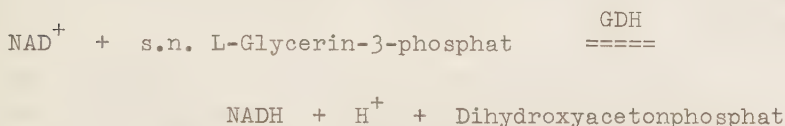
C. Experimenteller Teil

C.1.	Analytische Methoden	50
C.1.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
C.1.2.	Aminosäureanalysen	50
C.1.3.	Bestimmung der N-terminalen Aminosäure mit der Dansyl-Technik	50
C.1.4.	UV-Absorptionsspektren	51
C.1.5.	Radioaktivitätsmessung	52
C.2.	Peptidtrennung	52
C.2.1.	Säulenchromatographie	52
C.2.2.	Dünnschicht-Chromatographie	53
C.3.	Modifizierungsreaktionen	54
C.3.1.	Carboxymethylierung	54
C.3.2.	Umsetzung mit 4-Sulfophenylisothiocyanat	54
C.3.3.	Citraconylierung	55
C.4.	Spaltungen	55
C.4.1.	Bromcyanspaltung	55
C.4.2.	Enzymatische Spaltungen	55
C.4.2.1.	Tryptische Spaltung	55
C.4.2.2.	Spaltung mit Clostripain	56
C.4.2.3.	Chymotryptische Spaltung	56
C.4.2.4.	Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease	56
C.4.2.5.	Spaltung mit Aminopeptidase M	57
C.5.	Sequenzierung	57
C.5.1.	Dansyl-Edman-Abbau	57

C.5.2.	Sequenzierung nach der Solid-Phase-Methode	58
C.5.2.1.	Herstellung von APG- und DITC-Glas	58
C.5.2.2.	Ankopplungsreaktionen	58
C.5.2.3.	Automatischer Abbau im Solid-Phase-Sequencer	59
C.5.2.4.	Aufarbeitung der Thiazolinone	59
C.5.2.5.	Identifizierung der PTHs	59
D. . D i s k u s s i o n		61
E.	Z u s a m m e n f a s s u n g	68
F.	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	69
G.	V e r z e i c h n i s d e r A b k ü r z u n g e n	73

A. E I N L E I T U N G

Die Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH, EC. 1.1.1.8.) katalysiert die Reaktion:



Hohe Aktivitätsspiegel des im Cytosol lokalisierten Enzyms wurden in der Leber, im Fettgewebe und in Muskeln verschiedener Funktion gefunden (1,2). In der Leber, im Fettgewebe und in einigen Muskeltypen dient die GDH-Reaktion in erster Linie der Verknüpfung des Lipidstoffwechsels mit der Glykolyse (3). Die Hauptfunktion der Muskel-GDH besteht in der Aufrechterhaltung eines stationären Redoxzustands im cytosolischen NAD/NADH-System: In den Skelettmuskeln der Warmblüter verhindert die GDH - zusammen mit der LDH - eine Anhäufung von NADH und ermöglicht dadurch einen gleichbleibenden Fluß der anaeroben Glykolyse (Pyruvat-Glycerophosphat-Dismutation, 4,5). In den aeroben Flugmuskeln von Insekten vermittelt der Glycerophosphatcyclus den Eintritt des cytosolisch gebildeten Wasserstoffs in die mitochondriale Atmungskette (4,6,7). Dadurch wird - ohne notwendige Mitwirkung der LDH - die aerobe Glykolyse in Gang gehalten.

Die GDH gehört zu der großen Gruppe der Dehydrogenasen mit NAD als Coenzym. Einige dieser Enzyme sind in Funktion und Struktur bereits weitgehend charakterisiert, vor allem die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase,

Alkohol-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase, cytosolische Malat-Dehydrogenase und Glutamat-Dehydrogenase (EC. siehe Verz. der Abkürzungen) (8). Das gemeinsame Coenzym läßt Ähnlichkeiten im Katalysemechanismus und in der Struktur erwarten. Der Reaktionsmechanismus ist in keinem Fall vollständig aufgeklärt. Zumindest bei der LDH ist ein Histidinrest (His 195) am Protonentransfer zum Substrat beteiligt (9).

Von der GAPDH aus Hummer (10), Schwein (11), Hefe (12), der ADH aus Pferdeleber (13), Rattenleber (14), Menschenleber (15) und der GluDH aus Rinder- und Hühnerleber (16), Neurospora (17) sind die Aminosäuresequenzen bekannt; die Sequenzanalysen der LDH aus Hundshai M_4 (18), Huhn H_4 und M_4 (19) und aus Schwein H_4 und M_4 (Kiltz, H.-H. & Meyer, H., persönliche Mitteilung) sind fast abgeschlossen; die Sequenzierung der m-MDH wurde begonnen (Sutton, M. et al. siehe 63).

Vergleiche der bekannten Sequenzen ergaben keine weitreichenden Homologien wie etwa innerhalb der Familien der Serin-Proteasen (63) oder der Immunoglobuline (64). Dies schließt jedoch einen gemeinsamen Ursprung der noch ins anaerobe Zeitalter zurückreichenden Enzyme keineswegs aus. Tatsächlich zeigt sich eine deutliche Verwandtschaft, wenn man zum Vergleich die aus den Röntgenstrukturanalysen bekannte Konformation mit heranzieht. Danach haben die genannten Dehydrogenasen ähnlich gebaute "Domänen" für die Bindung des gemeinsamen Coenzym (8). Den Domänen der Raumstruktur liegen unterschiedliche Aminosäuresequenzen zugrunde, wobei jedoch vereinzelte Reste konservativ sind. Die Domänenhypothese der Struktur der NAD-abhängigen Dehydrogenasen stützt sich auf die bekannten Strukturen von GAPDH, ADH, LDH, GluDH und MDH. Sie wurde auch auf andere Proteine aus-

gedehnt, die Nucleotide als Coenzym benutzen (Flavodoxin, Phosphoglyceratkinase, Adenylatkinase). Eine Bestätigung und Erweiterung dieser Vorstellungen ist von der Struktur der GDH zu erwarten. Als Grundlage für direkte Sequenzvergleiche und für die geplante Röntgenstrukturanalyse (Rossmann) wird in diesem Arbeitskreis die Primärstruktur der GDH aus Kaninchenmuskel bearbeitet.

Die bekannten Primärstrukturen von NAD-abhängigen Dehydrogenasen (s.o.) wurden fast ausschließlich durch Sequenzierung von kleinen Spaltpeptiden mit manuellen Methoden bestimmt. Zur Abkürzung der mühevollen und langwierigen manuellen Prozeduren werden heute in der Sequenzanalytik in zunehmendem Maße automatische Methoden benutzt (65). Mit dem Sequenator nach Edman und Begg (57,37) können Proteine und Peptide über 30-70 Schritte automatisch sequenziert werden. Eine Variante der automatischen Sequenzierung ist die Solid-Phase-Methode, die in den letzten Jahren rasch Verbreitung gefunden hat (34,35). Bei dieser Methode wird das Peptid oder Protein kovalent an einen unlöslichen Träger gebunden und an der festen Phase automatisch sequenziert. Dabei werden Extraktionsverluste vermieden, so daß die Methode grundsätzlich für Peptide jeder Größe und für Proteine geeignet ist. Die Solid-Phase-Methode ist technisch einfach und wirtschaftlich. Voraussetzung für ihre Anwendbarkeit ist allerdings, daß die Peptide bzw. Proteine mit guter Ausbeute an den festen Träger angekoppelt werden können.

Die Solid-Phase-Methode wurde bei zahlreichen sequenzanalytischen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt, bisher fast ausschließlich als Ergänzung der manuellen Techniken oder des Edman-Begg-Sequenators (vgl. z.B. (66,67,68,69)). Bei konsequenter Anwendung sollte es je-

doch möglich sein, ausschließlich oder ganz überwiegend mit der Solid-Phase-Methode ein größeres Protein automatisch zu sequenzieren. Diese Strategie wird in diesem Institut bei der Sequenzanalyse der GDH verfolgt.

Die native GDH aus Kaninchenmuskel (Molekulargewicht 75 000) besteht aus zwei identischen Untereinheiten von je 350 Aminosäuren Länge (22,31). Eine direkte Ansequenzierung der Untereinheit mit dem Edman-Begg-Sequenzator bzw. mit der Solid-Phase-Methode ist nicht möglich, weil das Protein am N-Terminus acetyliert ist (31).

Um die Möglichkeiten der automatischen Sequenzierung voll auszuschöpfen, und den Aufwand für die Peptidisolierung gering zu halten, müssen durch selektive Spaltung der Untereinheit möglichst große Fragmente gewonnen werden. Besonders geeignet zur Ankopplung an den festen Träger sind Fragmente mit C-terminalen Homoserin, die bei der Spaltung der Methionylbindungen des Proteins mit Bromcyan entstehen (42). Die GDH-Untereinheit enthält 9 Methioninreste, von denen einer den C-Terminus bildet (31), so daß 9 Bromcyanpeptide zu erwarten sind. Das größte Bromcyanpeptid der GDH besteht aus 106 Aminosäuren und macht damit rund 30 % der gesamten Untereinheit aus. Die Sequenzanalyse dieses Bromcyanfragments behandelt die vorliegende Arbeit.

B. E R G E B N I S S E

1. Modifizierung und Spaltung der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchen- muskel

1.1. Reinheit der GDH

Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH) aus Kaninchenmuskel der Firma Boehringer Mannheim mit Fremdaktivitäten an Aldolase, GAPDH, LDH und TIM $< 0,01$ % besitzt von Charge zu Charge eine gleichbleibende Aminosäurezusammensetzung. In der Cellogelelektrophorese (Serva) bei pH 6,5 und pH 8,6 und der SDS-Gelelektrophorese (21) läuft sie als einheitliche Bande. Deshalb kann das kommerziell erhältliche Enzymprotein ohne weitere Reinigung für die Sequenzermittlung verwendet werden. Die GDH wird als Kristallsuspension in 3,2 M Ammoniumsulfatlösung geliefert und wurde vor der Modifizierungsreaktionen durch Gelfiltration an Sephadex G-50 entsalzt.

1.2. Modifizierung der Cysteine

Die GDH-Untereinheit besitzt 10 Cysteine und enthält keine Disulfid-Brücken (22). Die Cysteine wurden mit 2- ^{14}C -Jodessigsäure (23) alkyliert. Die Radioaktivität bewährte sich bei der Lokalisierung und Mengenbestimmung der Cysteinpeptide im Verlauf der Peptidisolierung sowie bei der Ermittlung der Kopplungsausbeuten bei der Solid-Phase-Sequenzierung. ^{14}C -Carboxymethyl-Cys-PTH war einfach nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen.

Mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) nach Ellman (24,25) wurden vor der Alkylierung 9,7 SH-Gruppen gefunden. Zur Verhinderung von Oxidation wurde vor der Carboxymethylierung 1,4-Dithioerythrit (26) zugesetzt (im molaren Verhältnis 1:3 zu den SH-Gruppen des Proteins). Durch einen geringen Überschuß an Jodessigsäure (2-fach über alle SH-Gruppen), die kurze Reaktionszeit von 1 h im Dunkeln und die Absättigung überschüssiger Jodessigsäure mit DTE wurde versucht, Nebenreaktionen an His, Lys, Met und Tyr zu vermeiden.

Nach der Umsetzung konnten mit DTNB keine SH-Gruppen mehr nachgewiesen werden. In der Aminosäureanalyse trat außer Carboxymethyl-Cys kein neuer Peak auf. Die spezifische Radioaktivität der carboxymethylierten GDH-Untereinheit ergab 22 nCi/nMol bzw. 2,2 nCi/nMol Cys. Die gleiche spezifische Radioaktivität wurde in isolierten Bromcyanpeptiden gefunden.

1.3. Bromcyanspaltung

Die carboxymethylierte GDH-Untereinheit (10 μ Mol) wurde in 75 % Ameisensäure mit einem 100-fachen Überschuß über alle 9 Methionine an Bromcyan 24 h bei Raumtemperatur gespalten (27).

1.4. Auftrennung der Bromcyanpeptide

Die primäre Auftrennung der Bromcyan-Spaltprodukte erfolgte an Sephadex G-50 in 30 % Ameisensäure. Wie Abb. 1. zeigt, wurden 8 Fraktionen geschnitten. Die 3 Fraktionen mit den größten Molekulargewichten prä-A, A und B wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Wie aus den Elutionsprofilen zu erkennen ist, enthalten alle 3 Fraktionen radioaktiv markiertes Cystein.

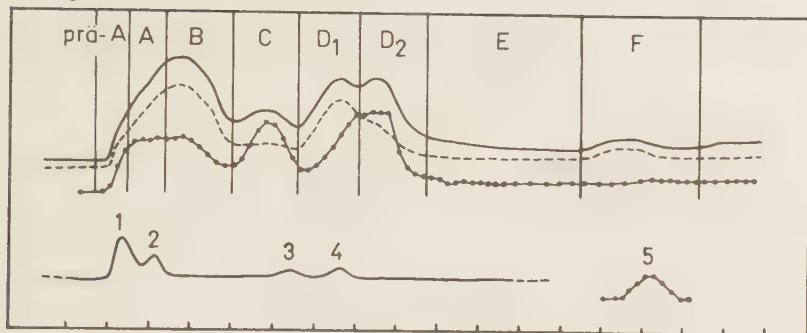


Abb. 1. Präparative Gelchromatographie der Bromcyanpetide der ^{14}C -CM-GDH ($2\ \mu\text{Mol}$) auf $1,2 \times 200$ cm Sephadex G-50 fine in 30 % Ameisensäure ($4,5\ \text{ml/h}$). Transmission bei 280 nm, 289 nm (gestrichelt) und Radioaktivität der 30 min-Fractionen.

Darunter ein Eichlauf mit Standards:

- 1, Rinderserumalbumin (MG = 67 000) + Myoglobin (MG = 17 800);
- 2, Cytochrom c (MG = 12 400);
- 3, Trasylol (MG = 6 500);
- 4, Melittin (MG = 2 840);
- 5, Tritiumwasser.

Zur Reinheitskontrolle der in diesen 3 Fractionen enthaltenen großen Fragmente wurden analytische SDS-Gelelektrophoresen (21) durchgeführt. Wie die Abb. 2. zeigt, bestehen die Säulenfractionen A und B aus einer Hauptkomponente B mit einem etwas kleineren scheinbaren Molekulargewicht als Cytochrom c. Vorwiegend in der Säulenfraction A sind noch die größeren Komponenten A 1 und A 2 enthalten. Die Säulenfraction prä-A enthält neben etwas B eine Bande mit einem kleineren Molekulargewicht als B. Bei dieser an G-50 zuerst eluierten Komponente handelt es sich wahrscheinlich um ein Aggregat, das in dem SDS-haltigen Gel der Elektrophorese dissoziiert wird. In der Gelfiltration auf Sephadex G-75, G-100 und G-200 blieb prä-A an der vorderen Ausschlußgrenze, wäh-

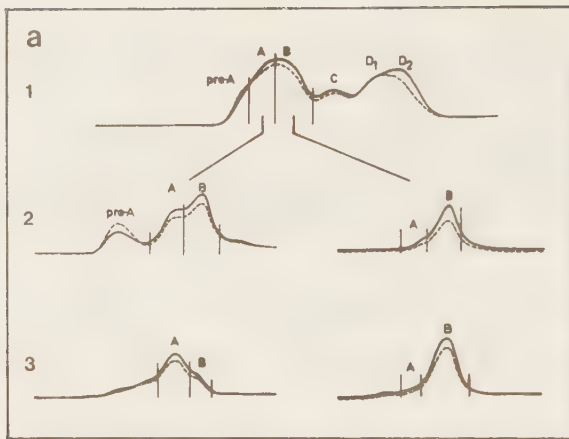
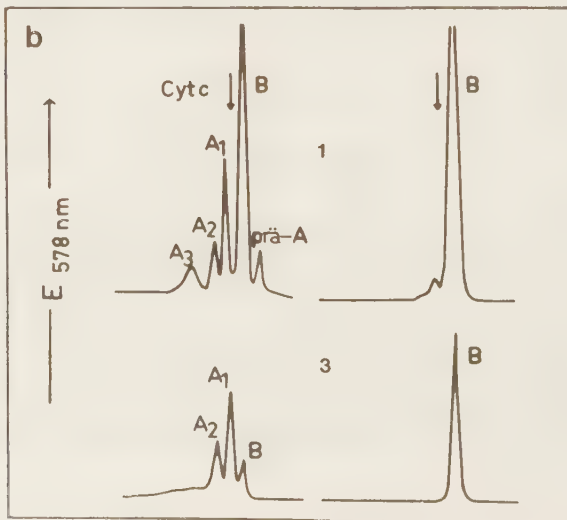


Abb. 2. Auftrennung der ersten 3 Gelfraktionien prä-A, A und B durch zweimalige Rechromatographie.

a): Elutionsprofile der primären Gelchromatographie (1) und von 2 aufeinanderfolgenden Rechromatographien (2 und 3) an 1,2 x 200 cm Sephadex G-75 fine in 30 % Ameisensäure (4,2 ml/h). Transmission bei 280 nm und 253 nm (gestrichelt).

b): Analytische SDS-Gelelektrophoresen der entsprechenden Peptidfraktionen vor (1) und nach der Rechromatographie (3). Densitogramme bei 578 nm nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue. Als Standard wurde Cytochrom c (MG = 12 400) aufgetragen.



rend der Doppelpeak von A und B mit wachsender Porengröße des Gels immer später eluiert wurde.

Die 2-malige Rechromatographie der Säulenfraktionen prä-A, A und B an Sephadex G-75 führte zu gelelektrophoretisch homogenen Banden von prä-A und B, während die angereicherte Fraktion A neben einem Rest B die zwei Banden A 1 und A 2 enthält (Abb. 2.). Aufgrund ihres Gehaltes an Methionin handelt es sich bei A 1 und A 2 um Fragmente aus unvollständiger Bromcyan-spaltung.

Die gelelektrophoretisch einheitliche Bande B stellt noch kein reines Peptid dar. Hinweise dafür sind der von der vorderen zur hinteren Peakflanke ansteigende Cystein- und Arginingehalt, das sich in gleicher Richtung umkehrende Ile/Leu-Verhältnis sowie das Auftreten der neuen Endgruppe Ile in der 2. Peakhälfte.

Erst nach Umsetzung der Lysine mit 4-Sulfophenylisothiocyanat (28) ließ sich B durch Gelchromatographie in ein argininfreies Peptid B I mit einem Cystein (~90 %) und in ein argininhaltiges Peptid B II mit 3 Cysteinen (~10 %) auftrennen. Das argininhaltige Peptid B II enthält Methionin und ist somit als unvollständig gespaltenes Fragment anzusehen.

Für die präparative Isolierung von B I konnten im Hinblick auf die beabsichtigte tryptische Spaltung die Lysine nicht irreversibel blockiert werden. Sie wurden im Peptidgemisch reversibel mit Citraconsäureanhydrid (29) blockiert. Im Gegensatz zu den 4-Sulfophenylthio-

carbamyl-Peptiden ließen sich die citraconylierten Peptide durch Gelchromatographie nicht ausreichend trennen. Deshalb wurde im Gemisch der Lysin-blockierten Peptide das argininhaltige Peptid B II selektiv mit Trypsin an den Argininen gespalten. Nach der Deblockierung wurden durch Gelfiltration die aus B II entstandenen Spaltprodukte abgetrennt und dadurch das erhalten gebliebene argininfreie Hauptpeptid B I in reiner Form isoliert. Die Gesamtausbeute vom reinen B I beträgt bei dieser Isolierungsprozedur 40 % bezogen auf die zur Bromcyanspaltung eingesetzte Menge an carboxymethylierter GDH-Untereinheit.

In einem analytischen Versuch gelang die Isolierung von B I aus dem nichtcitraconylierten Peptidgemisch nach Spaltung von B II mit der argininspezifischen Protease Clostripain (30).

Tabelle 1.

Aminosäureanalysen

	prä-A	B I	B I ^{a)}	GDH-UE ^{b)}
CM-Cys	0,93 (1)	0,84 (1)	0,89	
Asp	3,93 (4)	10,07 (10)	9,72	28
Thr c)	2,94 (3)	2,21 (2)	2,20	14
Ser c)	0,89 (1)	2,56 (2)	2,54	14
HSe	0,84 (1)	0,87 (1)	0,84	
Glu	3,99 (4)	9,99 (10)	10,17	42
Pro	1,03 (1)	7,12 (7)	6,80	16
Gly	4,93 (5)	10,92 (11)	10,94	40
Ala	4,03 (4)	6,97 (7)	7,17	32
Cys				10
Val d)	4,07 (4)	9,98 (11)	10,12	27
Met				9
Ile d)	2,66 (3)	12,23 (14)	12,38	26
Leu	3,12 (3)	8,98 (9)	9,14	28
Tyr		1,06 (1)	1,10	4
Phe	2,08 (2)	2,94 (3)	2,98	15
Trp e)		(1)		2
Lys	2,98 (3)	10,97 (11)	10,91	28
His		5,05 (5)	5,06	9
Arg	2,04 (2)			8
Gesamt	41	106		352
MG	4*354	11*460		37*500

a) aus dem nichtcitronylierten Gemisch von B I und B II durch Spaltung mit Clostripain erhalten.

b) nach (31)

c) extrapoliert auf die Hydrolysezeit 0

d) bestimmt durch 120 h Hydrolyse

e) spektrophotometrisch bestimmt nach (32,33)

2. Bestimmung der Aminosäuresequenz des Bromcyanpeptids B I

2.1. Sequenzierung des ungespaltenen B I mit dem Solid-Phase-Edman-Abbau

Die ersten 24 von 106 Positionen wurden durch direkten Abbau des ungespaltenen Polypeptids B I mit der Solid-Phase-Methode gewonnen. Die restlichen 82 Positionen wurden aus Spaltpeptiden bestimmt, die ebenfalls mit der Festphasen-Technik sequenziert wurden.

Bei der Solid-Phase-Methode wird das Peptid kovalent an einen unlöslichen Träger gebunden (34,35,36) (Abb. 3 A). In einer Säule durchläuft das Peptid an der festen Phase cyclisch die Reaktionen des Edman-Abbaus (37), die zur Abspaltung der jeweils N-terminalen Aminosäure als Anilino-thiazolinon-Derivat führen (Abb. 3 B). Nach Umwandlung in die stabileren Phenylthiohydantoine (PTHs) durch 1 N HCl werden die schrittweise abgespaltenen Aminosäuren identifiziert und daraus die Sequenz bestimmt (Abb. 3 C).

Als Träger diente porenkontrolliertes Glas (Controlled-Pore Glass, CPG) (38,39) mit geeigneten funktionellen Gruppen zur Ankopplung der Peptide. CPG besitzt eine große innere Oberfläche, die sowohl für die Peptide als auch für die beim Edman-Abbau verwendeten Reagenzien gut zugänglich ist. Im Gegensatz zu den Polystyrol-trägern (34) treten bei CPG keine Quellungs- und Schrumpfungsprozesse auf, so daß mit niedrigen Drucken in einer homogen gepackten Reaktionssäule gearbeitet werden kann.

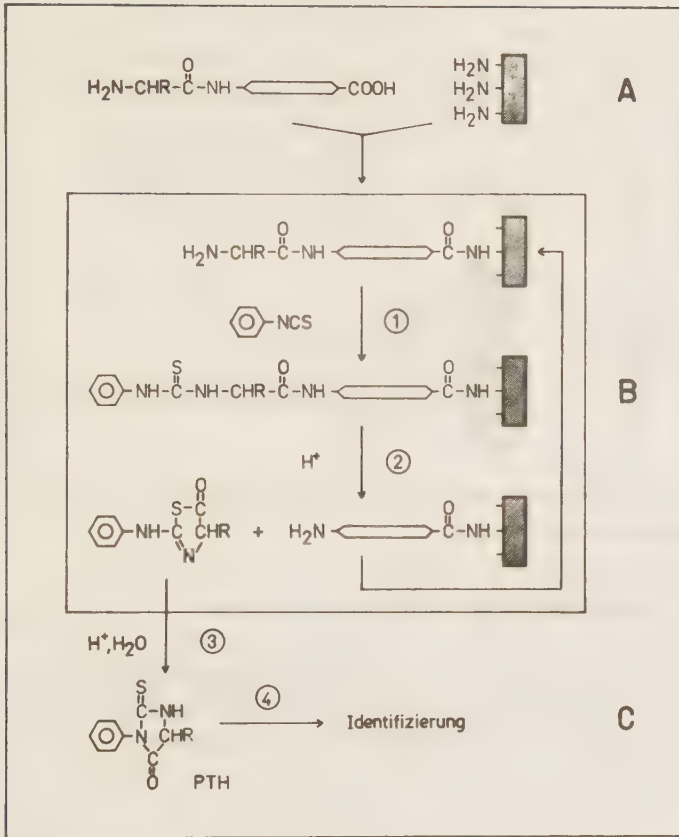
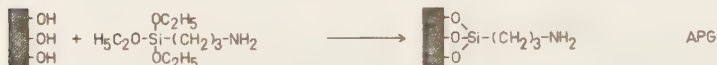


Abb. 3. Prinzip der Sequenzierung von Peptiden und Proteinen durch repetitiven Edman-Abbau am Festkörper.

- A. Kopplung des Peptids bzw. Proteins an einen unlöslichen Träger.
- B.1. Kopplung der α -Aminogruppe des Peptids mit Phenylisocyanat zum Phenylthiocarbamyl-Peptid.
- B.2. Cyclisierung mit wasserfreier Trifluoressigsäure und Abspaltung der N-terminalen Aminosäure als 2-Anilino-5-thiazolinon-Derivat.
- C.3. Konversion mit wässriger Säure (1 N HCl) zum 3-Phenyl-2-thiohydantoin-Derivat (PTH).
- C.4. Reinigung von störenden basischen Nebenprodukten über Dowex 50.

Die Schritte C.3. und C.4. werden außerhalb der Reaktionsssäule manuell durchgeführt.

Als funktionelle Gruppen zur Ankopplung der Peptide werden Aminoalkyl-Reste eingeführt. Durch Umsetzung der freien OH-Gruppen des Glases z.B. mit 3-Aminopropyl-triäthoxysilan entsteht das in dieser Arbeit verwendete 3-Aminopropyl-Glas (APG) mit einer Kapazität von 0,2 - 0,3 μMol Aminogruppen/mg Glas (40).



An diesen Träger wurde das Bromcyanpeptid B I über sein C-terminales Homoserin angekoppelt (42) (Abb. 4).

Die ungewöhnlich niedrige Kopplungsausbeute von nur 10 % dürfte hauptsächlich dadurch bedingt sein, daß das Peptid unter den Reaktionsbedingungen (DMF/TAA) nicht löslich ist und aus einer Suspension gekoppelt werden mußte. Bei der automatischen Sequenzierung des am Glas gebundenen Peptids konnten die ersten 24 Positionen bestimmt werden zu:

1	5	10	
Trp-Val-Phe-Glu-Glu-Asp-Ile-Gly-Gly-Lys-Lys-Leu-Thr-			
	18	24	
Glu-Ile-Ile-AsN-Thr-His-Glu-Glu-AsN-Val-Lys-	-	-	-

Die Identifizierung der PTHs erfolgte dabei durch Gaschromatographie (44, 45) und Dünnschicht-Chromatographie (43).

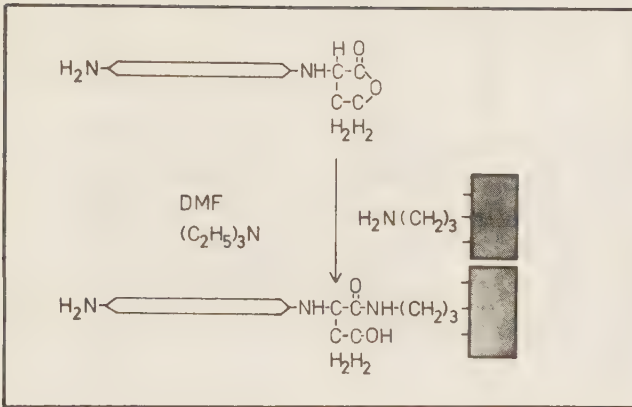


Abb. 4. Homoserinlacton-Kopplung von Bromcyanpeptiden an APG

Zunächst wird das C-terminale Homoserin, welches im Gleichgewicht mit seinem Lacton steht (41), durch Behandlung mit wasserfreier Trifluoressigsäure quantitativ in Homoserinlacton überführt.

Bei der Aminolyse des Lactons durch die Aminopropylgruppen des Glases wird das Peptid über eine Säureamidbindung an den Träger fixiert.

Das nur am C-terminalen Ende gebundene Peptid kann durchgehend sequenziert werden einschließlich des C-terminalen Homoserins.

Durch Gaschromatographie wurden die Aminosäure-Derivate in den Positionen (1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 18 und 23) bestimmt (Abb. 5).

Die anderen Aminosäure-Derivate (Glu 4, 5, 14, 20, 21, Asp 6, AsN 17 und 22 und Lys 10, 11, 24) wurden durch zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie auf Poly-

amidplatten identifiziert (43). Für diese polaren Aminosäure-PTHs ist der gaschromatographische Nachweis weniger empfindlich und schlecht reproduzierbar.

His in Position 19 wurde nach Rückhydrolyse des PTHs mit HJ (46) in der Aminosäureanalyse bestimmt. Bei der Reinigung über Dowex 50 werden die kationischen PTHs von Arg und His zurückgehalten. Deshalb wird von jedem Abbauschritt vor der Dowex-Reinigung ein Aliquot zur eventuellen Rückhydrolyse entnommen.

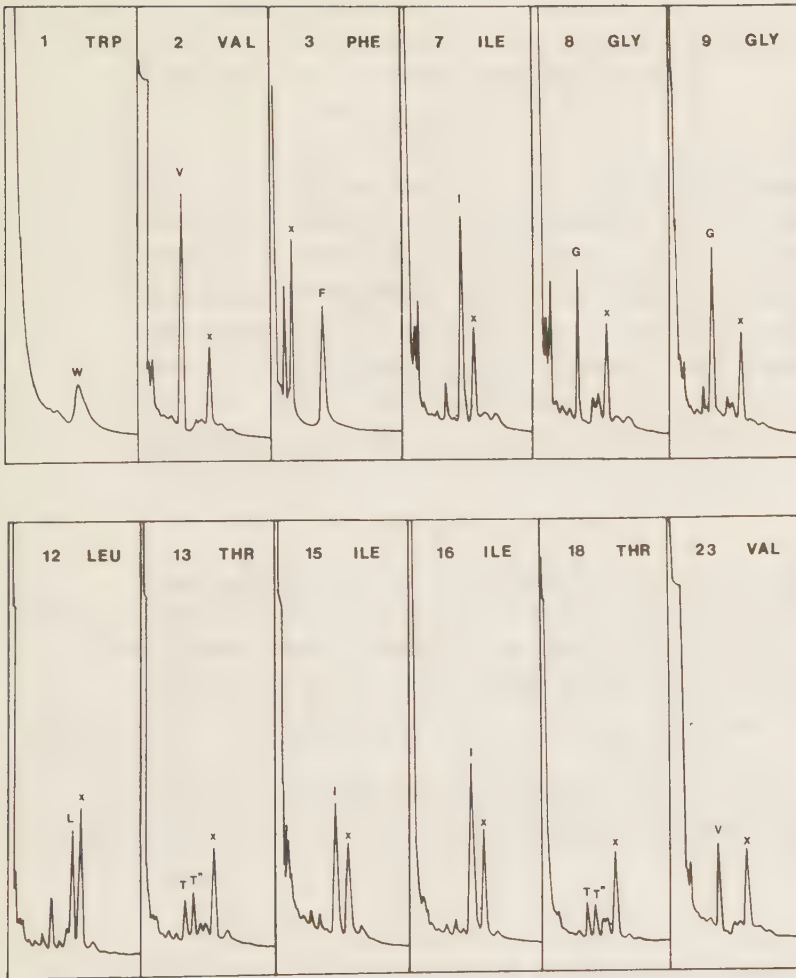


Abb. 5. Gaschromatogramme vom Solid-Phase-Abbau des Polypeptids B I

Auftragsmenge je 1/20 der Probe. Isotherme Läufe bei 260 °C (1), 220 °C (3), 190 °C alle übrigen. Flammenionisationsdetektor, Vollausschlag = 10^{-10} A. Der interne Standard Nor-Leucin ist mit x bezeichnet. Die PTHs von VAL und Gly haben unter diesen Bedingungen sehr ähnliche Retentionszeiten und wurden als Trimethylsilyl-Derivate unterschieden (hier nicht gezeigt).

2.2. Tryptische Peptide von B I

Zur Sequenzierung der noch unbekannten 84 Positionen mit der Festphasen-Methode mußten geeignete Spaltstücke hergestellt werden. Dies gelang mit guten Ausbeuten nur durch die tryptische Spaltung. Da B I 11 Lysine und kein Arginin enthält, kam die häufig angewendete Beschränkung der tryptischen Spaltung auf Arginin hier nicht in Frage und es mußten alle 12 tryptischen Peptide isoliert werden (Bezeichnung der tryptischen Peptide T 1 - T 12 siehe Tabelle 6, Seite 48 und 49).

Da sich B I im alkalischen Milieu nicht löst, wurde TPCK-Trypsin einer Suspension des Peptids zugesetzt. Nach einer 1/2 h Inkubation entstand jedoch eine klare Lösung. Der Spaltansatz wurde nach 3 h lyophilisiert.

2.2.1. Primäre analytische Charakterisierung der tryptischen Peptide von B I

Eine primäre analytische Charakterisierung der tryptischen Spaltstücke erfolgte durch eine Kombination von Gelfiltration auf Sephadex G-50 und Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel. Auf der Kieselgelplatte waren nach Anfärbung mit Fluorescamin (47,48) im wesentlichen 13 fluoreszierende Flecken zu erkennen (Abb. 6). Mit Hilfe der zugehörigen Elutionsprofile konnte auf der DC-Platte jeweils ein Fleck als radioaktiv (T 7), einer als tryptophanhaltig (T 1) und einer als tyrosinhaltig

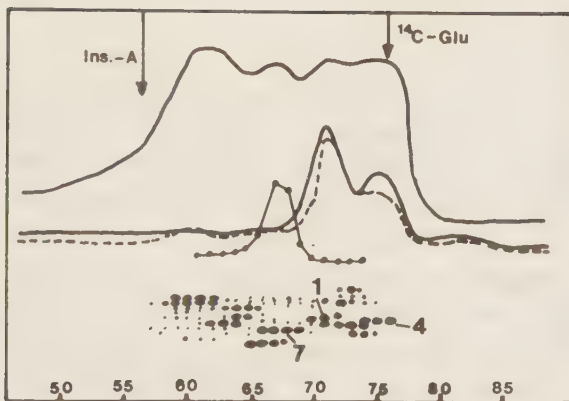


Abb. 6. Analytische Gelchromatographie der tryptischen Peptide von B I

Auf 0,3 x 150 cm Sephadex G-50 sf in 0,1 M AHC pH 8,6 (270 μ l/h). Transmission bei 224 nm, 280 nm, 253 nm (gestrichelt) und Radioaktivität der Fraktionen.

Darunter analytische Dünnschicht-Chromatographie der 30 min-Fraktionen. Zur Abschätzung der Molekulargewichte sind die Positionen von Insulin-A-Kette (MG = 2 400) und ¹⁴C-Glutaminsäure eingezeichnet.

(T 4) charakterisiert werden. Nach einem Eichlauf liegen die Molekulargewichte der größten tryptischen Peptide unter 2 400 (Insulin-A-Kette). Aus dem Homoserinegehalt der Aminosäureanalyse ging hervor, daß die Fraktion mit den größten Peptiden das C-terminale Peptid enthielt.

2.2.2. Sequenzierung des C-terminalen Homoserinpeptids

Aus dem Peptidgemisch wurde das C-terminale tryptische Peptid über sein Homoserinlacton (42) selektiv an APG angekoppelt (vgl. 2.1.). Dazu wurde das Spaltgemisch an Sephadex G-50 (30 % Essigsäure) grob vorfraktioniert und nur die Fraktion der großen Peptide zur Kopplung eingesetzt. Alle noch im Gemisch vorhandenen Peptide ohne C-terminales Homoserin reagieren nicht und lassen sich durch Gelchromatographie zurückgewinnen. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot des beladenen Trägers hydrolysiert. Die Aminosäureanalyse zeigte, daß aus dem Gemisch ein einheitliches Peptid mit 14 Aminosäuren gebunden worden war. Eine übereinstimmende Aminosäureanalyse zeigte das später durch Ionenaustausch- und Gelchromatographie isolierte C-terminale Peptid. Die Kopplungsausbeute betrug 45 % bezogen auf das radioaktiv markierte Cysteinpeptid bei Annahme einer vollständigen tryptischen Spaltung.

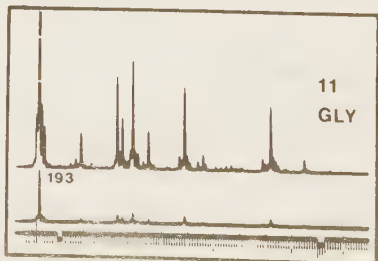
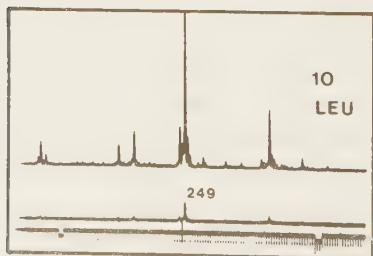
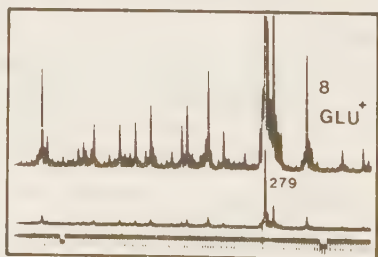
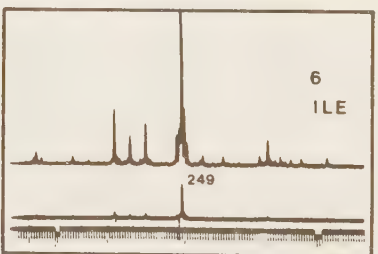
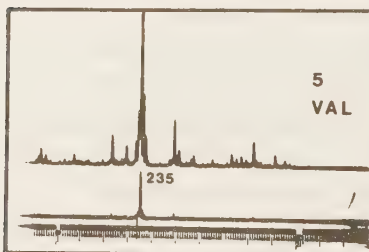
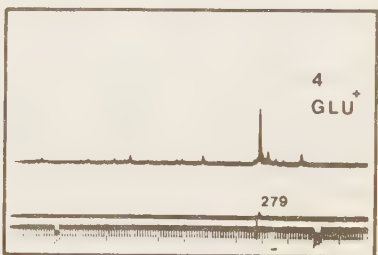
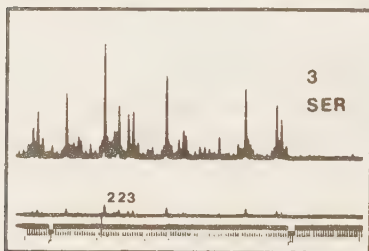
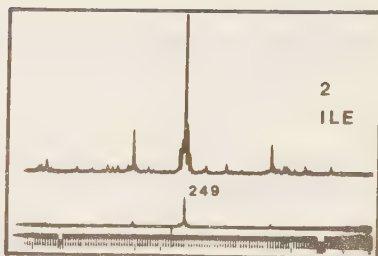
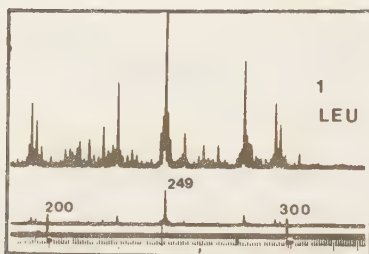
Die beim automatischen Abbau gewonnenen PTHs wurden durch Massenspektrometrie nachgewiesen (Abb. 7). Mit dieser Methode können alle PTHs außer PTH-Arg direkt identifiziert werden. Bei der hier benutzten chemischen Ionisation (49) wird eine Fragmentierung vermieden und man erhält fast ausschließlich Molekularionen der Masse $M+1$. Aufgrund der verschiedenen Massen der Molekularionen können die PTHs fast aller Aminosäuren auch im Gemisch eindeutig unterschieden werden. Eine Ausnahme bilden die Isomeren PTH-Ile und -Leu. Sie wurden durch einen isothermen GC-Lauf differenziert. Aus den Massenspektren (Abb. 7) und den Gaschromatogrammen ergab sich

die Sequenz des C-terminalen Peptids T 12 :

Leu-Ile-Ser-Glu-Val-Ile-Gly-Glu-His-Leu-Gly-Ile-Pro-Met

His 9 wurde durch Rückhydrolyse (46) bestimmt.
Glu 4 und 8 lagen fast ausschließlich als Methylester
vor. Die Veresterung erfolgt bei der Reinigung der PTHs
an Dowex 50 in Methanol/HCl.

Die Verdampfung der Aminosäure-PTHs im Massenspektrometer erfolgt bei unterschiedlichen Temperaturen (70 - 160 °C). Bei dem verwendeten Temperaturgradienten wird der maximale Ionenstrom für die einzelnen PTHs zu verschiedenen Zeitpunkten erreicht. Zur eindeutigen Identifizierung war es deshalb nötig, während der ganzen Verdampfungsvorgänge die Massenspektren am Oszilloskop zu verfolgen. Die in Abb. 7. gezeigten Registrierungen sind Momentaufnahmen charakteristischer Spektren, soweit möglich im Maximum des Ionenstroms des jeweiligen PTHs.



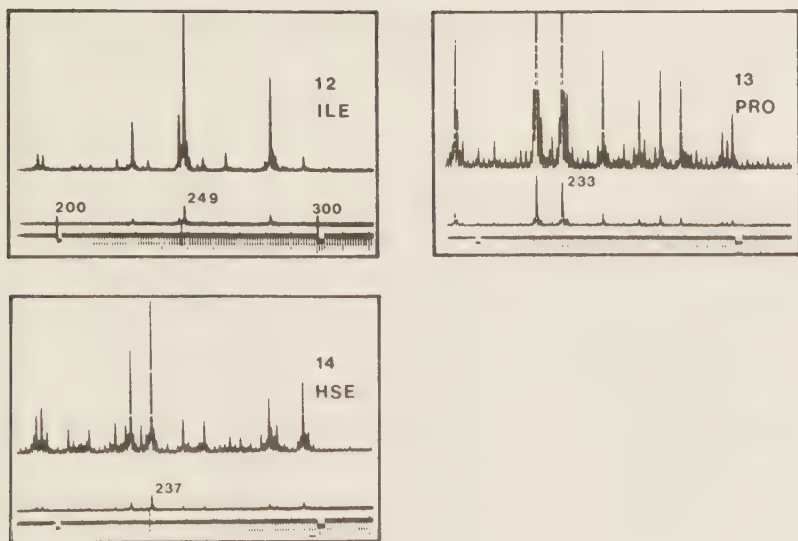


Abb. 7. Massenspektren vom automatischen Abbau des C-terminalen Homoserin-Peptids T 12 an APG

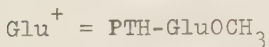
Chemische Ionisation mit Isobutan.

Die Empfindlichkeit der beiden übereinanderliegenden Registrierungen unterscheidet sich um den Faktor 10, wobei in der oberen Spur die Peaks teilweise abgeschnitten sind.

Massenskala in Schritt 1 und 12.

Einsatzmenge je 1/8 der Probe entsprechend etwa 2 nMol in Schritt 2.

Die Spektren 1, 3, 8, 13 und 14 wurden mit 10-fach höherer Verstärkung aufgenommen als die der übrigen Schritte. Der Peak des in der jeweiligen Position identifizierten PTHs ist mit der Massenzahl M+1 bezeichnet.



In den Schritten 13 und 14 tritt zusätzlich ein Peak mit der gleichen Masse wie PTH-Serin auf (223), das jedoch nach der Aminosäureanalyse auszuschließen ist.

2.2.3. Isolierung der tryptischen Peptide von B I

Die Auftrennung der tryptischen Peptide erfolgte durch Anionenaustausch-Chromatographie auf QAE-Sephadex und anschließende Rechromatographie auf Sephadex G-50 bzw. Biogel P-2. Bei jedem Säulenlauf erfolgte die Reinheitskontrolle und Charakterisierung der Peptidfraktionen durch eindimensionale Dünnschicht-Chromatographie und Endgruppenbestimmung mit der Dansyl-Methode (50). Nach diesen Kriterien wurden schon durch die primäre Ionenaustausch-Chromatographie (Abb. 8) die Peptide T 1, T 3 und T 10 in reiner Form erhalten. Alle übrigen Fraktionen wurden auf geeigneten Gelen rechromatographiert (Tabelle 2). Als Anhaltspunkt für die Wahl des Gels diente die nach der analytischen Gelchromatographie (Abb. 6) zu erwartende Peptidgröße. Als charakteristische Beispiele werden in Abb. 9.a. und 9.b. die Rechromatographien mit den Peptiden T 12 (Homoserinpeptid) und T 7 (Cysteinpeptid) bzw. T 8 + T 11 und T 4 (Tyrosinpeptid) gezeigt.

Auf diese Weise wurden aus dem tryptischen Spaltansatz 12 reine Peptide und freies Lysin dargestellt. Die Peptide T 8 + T 11 wurden fast ausschließlich als Gemisch erhalten und nicht weiter aufgetrennt. Aus der vorderen Flanke des Peaks in der Gelchromatographie konnten jedoch 15 nMol reines T 11 gewonnen werden. Diese Menge reichte aus für eine Aminosäureanalyse und für die Sequenzierung des Tripeptids mit der Dansyl-Edman-Methode (51). Die Aminosäurezusammensetzung von T 8 ergab sich aus der Subtraktion: $T\ 8 = (T\ 11 + T\ 8) - T\ 11$. Außerdem fiel nach Rechromatographie auf Biogel P-2 das



Abb. 8. Präparative Anionenaustausch-Chromatographie der tryptischen Peptide von B I auf 0,3 x 150 cm QAE-Sephadex A-25, äquilibriert mit 25 mM AHC pH 8,8. Elution mit einem linearen Konzentrationsgradienten dieses Puffers von 25 mM bis 1 M (2,46 ml/h). Transmission bei 224 nm, 280 nm, 253 nm (gestrichelt) und Radioaktivität der 30 min-Fractionen (—•—•). Darunter die analytische Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel mit Bezeichnung der tryptischen Peptide.

Peptid T 8a an, das gegenüber T 8 um 1 Lysin verkürzt ist.

Alle 11 Lysine des Polypeptids B I wurden in verschiedenen Peptidfragmenten bzw. als freies Lysin wiedergefunden. 6 weitere Peptide enthalten kein Lysin: T 12 war das bereits sequenzierte C-terminale Homoserinpeptid. Die lysinfreien Peptide T 6a, T 6a', T 6b und T 8a erwiesen sich als Fragmente, die durch chymotryptische Spezifität der verwendeten Enzympräparation an TPCK-Trypsin entstanden waren. Das N-terminal um Ala-AsN verkürzte Peptid T 9a dürfte wohl durch Säurespaltung entstanden sein (Ala-AsN[↓]Ala-----Lys).

Ausgehend von 800 nMol Bromcyanpeptid B I wurden, verteilt auf 2 Austauscherläufe, alle beschriebenen Peptide in Mengen von 15 nMol bis 620 nMol isoliert, die in jedem Fall für die Sequenzierung ausreichend waren.

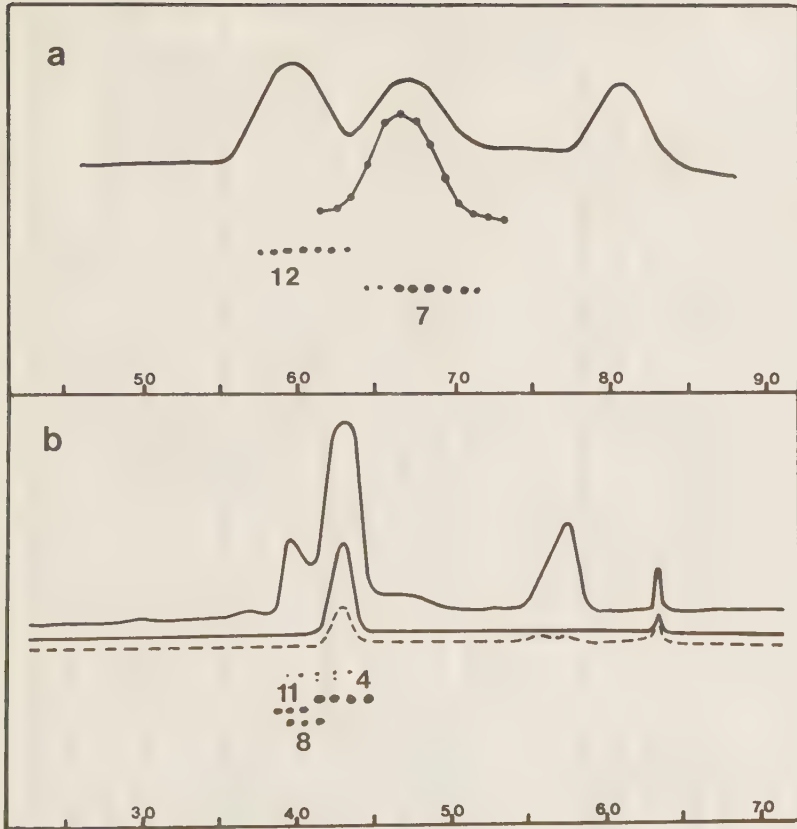


Abb. 9.a. Präparative Rechromatographie des Peptidgemisches T 7 und T 12 auf 0,8 x 150 cm Sephadex G-50 sf in 0,1 M AHC-Puffer pH 8,6 (1,8 ml/h). Transmission bei 224 nm, Radioaktivität der 30 min-Fractionen. Darunter analytische Dünnschicht-Chromatographie der Fractionen.

b. Präparative Rechromatographie des Peptidgemisches T 8 + T 11 und T 4 auf 0,8 x 150 cm Biogel P-2 in 0,1 M AHC-Puffer pH 8,6 (1,8 ml/h). Transmission bei 224 nm, 280 nm, 253 nm (gestrichelt), darunter Dünnschicht-Chromatographie der 30 min-Fractionen.

Tabelle 2.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6a	T6a'	T6b	T6c	T7	T8	T8a	T9	T9a	T10	T11	T12	
OM-Cys										0,92								1
Asp	1,09		1,92		1,99	1,93	2,04		0,10	1,04			1,04		1,08		0,17	10
Thr			1,90														0,16	2
Ser	0,14				0,08	0,09			0,11	0,11			0,90	1	0,08		0,86	2
HSe																	0,82	1
Glu	2,15		3,03							1,05					1,03		2,08	10
Pro				1,15	3,01			1,00							1,02		1,09	7
Gly	2,04		0,25	1,03	0,12	0,09			1,09	0,12	1	1,03	1,11	1	1,88	1,04	1,97	11
Ala	0,08		0,19		1,03	3,98	3,93		0,15	0,06			1,96	1	0,05		0,16	7
Val	0,78		0,81		4,35			1,75	0,08				2,99	3	0,98		0,87	11
Ile	1,01		1,65			2,05	1,21		1,01	1,91							2,58	14
Leu			1,15	0,98	0,99	1,09	1,02		0,16		1	0,97	1,01	1		0,96	1,95	9
Tyr				0,61														1
Phe	0,93					0,96	0,20		0,91									3
Trp	1b)																	1
Lys	1,02	1	0,90	1,15	1,05				1,11	1,05	1	0,17	0,98	1	1,05	1,02		11
His			1,15	0,85				1,00	0,13		1	0,99					0,97	5
Gesamt	10	1	13	6	13	10	(8)	4	5	6	4	(3)	10	(8) ^{c)}	7	3	14	106

Tabelle 2.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6a	T6a'	T6b	T6c	T7	T8	T8a	T9	T9a	T10	T11	T12	
d)	-	G-50	-	P-2	G-50	G-50	G-50 P-2 T6a T6a'	G-50	P-2	G-50	G-50 P-2 T8+11	P-2	G-50	G-50 ange- trennt	G-50	G-50	G-50 P-2 T8+11	G-50
e)	Bio gel P - 2 3 0 % H A c																	
N-Term.	f) Trp	Lys	Leu	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Glu	Ile	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	

- a) Bestimmt nach 120 h Hydrolyse
- b) Spektrophotometrisch bestimmt nach (32,33)
- c) Die in Klammer gesetzten Peptide T 6a', T 8a und T 9a wurden bei der Summierung der einzelnen Aminosäuren nicht berücksichtigt, da es sich um Fragmente der Peptide T 6a, T 8 und T 9 handelt.
- d) Verwendete Gele zur Rechromatographie der tryptischen Peptide in 0,1 M AHC pH 8,6
- e) Gelchromatographie zur Abtrennung von störenden Nucleophilen vor der Sequenzierung mit der Solid-Phase-Methode.
- f) Dansyl-Methode (50)
- g) Als PTH gaschromatographisch bestimmt (vgl. Abb. 5)

2.2.4. Sequenzierung der tryptischen Peptide

2.2.4.1. Sequenzierung mit der Solid-Phase-Methode

Die Peptide T 1, T 3, T 4, T 5, T 6c, T 7, T 9, T 9a und T 10 wurden mit der Festphasen-Methode an porösem Glas automatisch sequenziert. Alle diese Peptide enthalten C-terminales Lysin, über dessen ϵ -Aminogruppe sie an DITC-Glas (52) angekoppelt wurden (Abb. 10). Bei dieser Methode wird stets auch die N-terminale Aminosäure an den Träger fixiert und bleibt nach dem ersten Edman-Abbau am Glas hängen. Deshalb muß die N-terminale Aminosäure vorher mit der Dansyl-Technik bestimmt werden.

Die Kopplungsreaktionen wurden vorzugsweise in wasserfreiem DMF/TAA (10:1) durchgeführt. Nach Behandlung mit wasserfreier TFA und Trocknen im Vakuum waren alle Peptide in diesem Milieu löslich (39). Die Kopplungsausbeuten waren in jedem Fall besser als 40 %, meistens sogar zwischen 80-90 %. Die zur Kopplung eingesetzten Peptidmengen lagen zwischen 50 nMol (T 6c) und 200 nMol (T 7).

Die Identifizierung der beim Solid-Phase-Abbau der tryptischen Peptide von B I anfallenden PTHs erfolgte durch Gaschromatographie, Massenspektrometrie und Aminosäureanalyse nach HJ-Rückhydrolyse. Die mit der Solid-Phase-Methode bestimmten Sequenzen der tryptischen Peptide sind in Tabelle 3.a. zusammengestellt.

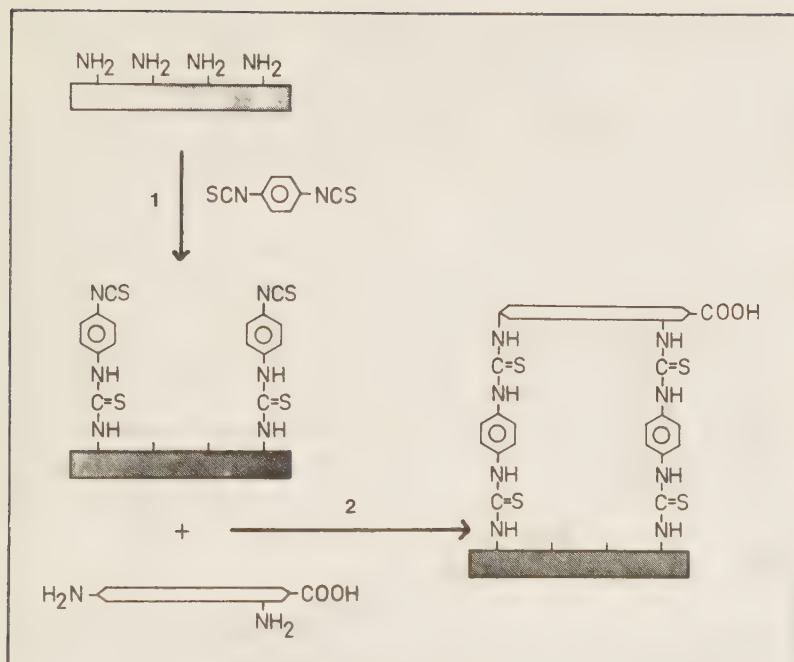


Abb. 10. Ankopplung von Peptiden an DITC-Glas

1. Durch Umsetzung von APG mit dem bifunktionellen Senfölgas p-Phenyldiisothiocyanat (DITC) entsteht ein Träger mit funktionellen Phenylisothiocyanat-Gruppen (DITC-Glas). DITC-Glas ist über lange Zeit stabil.
2. Peptide und Proteine werden über ihre Aminogruppen (ϵ -Aminogruppen von Lysin und α -Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure) an DITC-Glas gebunden.

Die Gaschromatographie ermöglicht die quantitative Bestimmung einiger PTHs z.B. PTH-Pro, -Ala, -Val, -Leu, -Ile, -Phe und damit die Berechnung der Ausbeuten bei der automatischen Sequenzierung. Ein typisches Beispiel

zeigt Abb. 11 für das tryptische Peptid T 5. Die bei jedem Abbauschritt erzielte PTH-Ausbeute (repetitive Ausbeute) beträgt für Abbauteilen am porösen Glas durchschnittlich 91 - 94,5 %; der mittlere Überhang in dem (n+1)-ten Schritt (Overlap) liegt bei 1-2 % pro Schritt.

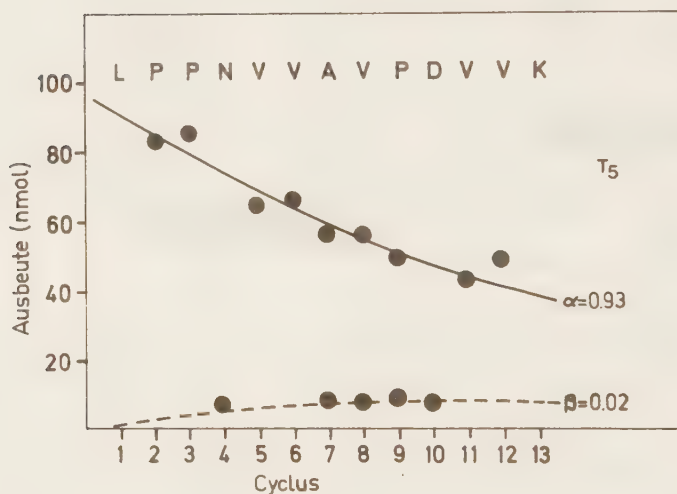


Abb. 11. Repetitive Ausbeute beim Abbau des tryptischen Peptids T 5

Gaschromatographisch (FID) bestimmte Ausbeuten von PTH-Pro (P), -Val (V), -Ala (A) bei der Solid-Phase-Sequenzierung des tryptischen Peptids T 5 an DITC-Glas. Die Meßwerte sind durch schwarze Punkte dargestellt. Aus den Kurven für die Ausbeuten im n-ten Schritt (ausgezogene Linie) und im (n+1)-ten Schritt = Overlap (gestrichelte Linie) berechnen sich eine durchschnittliche repetitive Ausbeute $\alpha = 93 \%$ und ein mittlerer Overlap $\beta = 2 \%$.

Die Peptide T 9 und T 9a trennen sich bei der Rechromatographie auf Sephadex G-50 nur unvollständig. Deshalb wurde das Gemisch zur Kopplung eingesetzt, das T 9 und T 9a im Verhältnis 3:1 enthielt. Die Sequenzierung eines derartigen Gemisches war möglich, weil alle PTHs quantitativ bestimmt werden können. Dies wird durch die Kombination des Massenspektrometers mit einem Computersystem erreicht, welches für 32 frei wählbare Massen den Ionenstrom alternierend mißt und aufsummiert (Schwab, A., Schwab, H., Wachter, E., Otto, J. & Machleidt, W., unveröffentlicht). In der graphischen Darstellung der Meßergebnisse (Abb. 12) erkennt man neben der Hauptsequenz von T 9 die Sequenz des untergeordneten Peptids T 9a. Demnach ist T 9a ein N-terminal um Ala-AsN verkürztes Teilstück des Peptids T 9.

2.2.4.2. Sequenzierung mit der Dansyl-Edman-Technik

Die kurzen Peptide T 6b, T 8a, T 11 und das Gemisch T 8 + T 11 wurden mit der Dansyl-Edman-Methode (51) sequenziert, ebenso das Zehnerpeptid T 6a.

Bei der sauren Hydrolyse von dansylierten Peptiden werden die Säureamide AsN und GlN zerstört. Deshalb wurde eine enzymatische Hydrolyse der freien Peptide mit Aminopeptidase M (53) durchgeführt und die Amide mit der Aminosäureanalyse nachgewiesen.

Tabelle 3.a.

Sequenzen der tryptischen Peptide mit der Solid-Phase-Methode an DITC-Glas a)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
T 1	b) Trp-Val-Phe-Glu-Glu-Asp-Ile-Gly-Gly-Lys													
T 3	Leu-Thr-Glu-Ile-Ile-AsN-Thr-His-Glu-Glu-AsN-Val-Lys													
T 4	Tyr-Leu-Pro-Gly-His-Lys													
T 5	Leu-Pro-Pro-AsN-Val-Val-Ala-Val-Pro-Asp-Val-Val-Lys													
T 6c	c) Gln-Phe-Ile-Gly-Lys													
T 7	Ile-Cys-Glu-Asp-Ile-Lys													
T 9 d)	Ala-AsN-Ala-Ile-Gly-Ile-Ser-Leu-Ile-Lys													
T 9a d)	Ala-Ile-Gly-Ile-Ser-Leu-Ile-Lys													
T 10	Gly-Val-AsN-Glu-Gly-Pro-Lys													
T 12 e)	Leu-Ile-Ser-Glu-Val-Ile-Gly-Glu-His-Leu-Gly-Ile-Pro-Met													

Tabelle 3.b. Sequenzen der tryptischen Peptide mit der Dansyl-Edman-Methode

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T 6a	Ala-Ala-Ala-Asp- ^{c)}	Ala-Asp- ^{c)}	Ala-Asp-Ile-Leu-Ile-Phe							
T 6b	Val-Val-Pro-His									
T 8a	Gly-His-Leu									
T 8+T 11 f)	Gly-His-Leu-Lys									
	Gly-Leu-Lys									
T 11	Gly-Leu-Lys									

- a) Die N-terminalen Aminosäuren wurden mit der Dansyl-Technik bestimmt (50).
- b) Trp 1 in T 1 wurde gaschromatographisch beim Abbau von B I nachgewiesen.
- c) Differenzierung zwischen Säure und Amid durch Spaltung mit Aminopeptidase M (53).
- d) Als Gemisch sequenziert (siehe Abb. 12).
- e) Als C-terminales Peptid über Homoserinlacton an APG gekoppelt (vgl. 2.2.2.).
- f) Als Gemisch sequenziert.

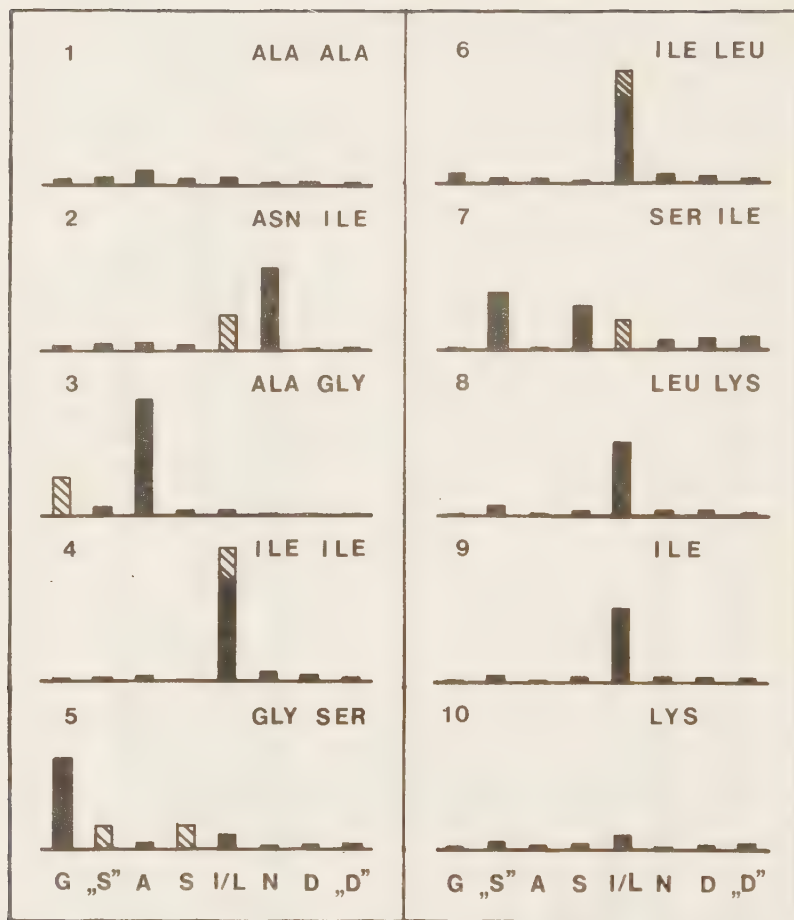


Abb. 12. Quantitative Bestimmung der PTHs vom Festphasen-Abbau des Peptidgemisches T 9 + T 9a durch Massenspektrometrie. Die Höhe der Säulen ist proportional dem integrierten Ionenstrom für die einzelnen PTH-Massen bezogen auf den Ionenstrom des Standards α -Aminobuttersäure-PTH. Dieser interne Standard ist in der für den Solid-Phase-Abbau verwendeten Tri-fluoressigsäure enthalten.



Hauptsequenz des Peptids T 9



Sequenz des untergeordneten Peptids T 9a

"S" = PTH- Δ -Serin, "D" = PTH-AspOCH₃,

2.3. Überlappung der tryptischen Peptide

Durch Festphasen-Abbau des ungespaltenen B I über 24 Schritte (vgl. 2.1.) wurde die Reihenfolge der tryptischen Peptide T 1, T 2, T 3 festgelegt, wobei es sich bei T 2 um das freie Lysin handelt. T 12 ist durch sein endständiges Homoserin als C-terminales Peptid von B I charakterisiert. Die Aneinanderreihung der dazwischenliegenden Peptide T 4 - T 11 erfolgte durch Überlappen der Fragmente aus Spaltungen mit Chymotrypsin und der glutaminsäurespezifischen Protease aus *Staphylococcus aureus* (54,55).

2.3.1. Chymotryptische Peptide

Zunächst wurde an einer analytischen Menge von 50 nMolen der zeitliche Verlauf der Spaltung mit Chymotrypsin untersucht. Dazu wurden nach verschiedenen Zeiten (1', 2', 5', 10', 20', 30', 45', 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, bei Raumtemperatur) die Spaltprodukte durch eindimensionale Dünnschicht-Chromatographie charakterisiert. In den ersten 20 min wurden lediglich 3 neue Peptidbanden beobachtet. Anschließend nimmt die Zahl der Banden zu und ändert sich nach 3 h nicht mehr wesentlich. Deshalb wurden die Spaltprodukte nach 10 min und 6 h durch analytische Gelchromatographie verglichen (Abb. 13). Die Elutionsprofile ermöglichen eine Abschätzung der relativen Peptidgrößen und Spaltungsausbeuten.

Sehr deutlich erkennt man die Zunahme der kürzeren Fragmente bei längerer Spaltzeit. Die Dünnschicht-Chromato-

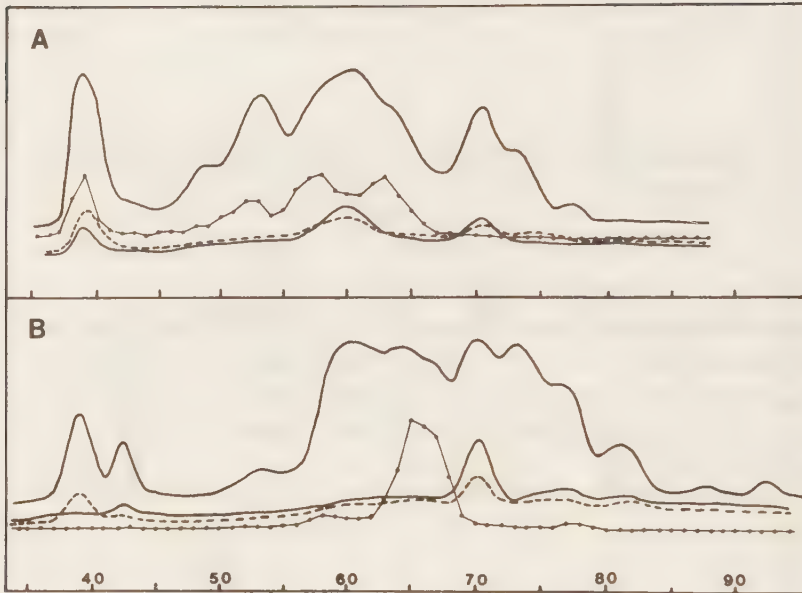


Abb. 13. Analytische Gelchromatographie der chymotryptischen Spaltprodukte von B I (je 35 nMol).

A: nach 10 min Spaltung bzw.

B: nach 6 h Spaltung bei Raumtemperatur

0,3 x 150 cm Sephadex G-50 sf 0,1 M AHC pH 8,6 (270 μ l/h).
Transmission bei 225 nm, 280 nm, 253 nm, (gestrichelt)
und Radioaktivität der 30 min-Fractionen (— · — · —).

graphie der Fraktionen zeigt für die 10 min-Spaltung eine Vielzahl schwacher Banden, während nach 6 h-Spaltung eine kleinere Anzahl diskreter und intensiv fluoreszierender Flecken auftritt. Denselben Unterschied zeigt die Verteilung der Radioaktivität des einzigen Cysteinrestes in den Elutionsprofilen. Aufgrund dieser Befunde wurde die Spaltung einer größeren Menge über 6 h durchgeführt.

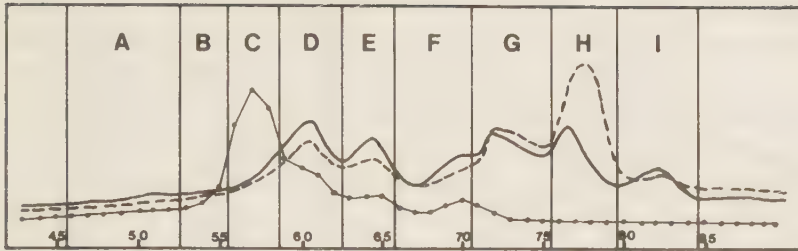


Abb. 14. Primäre Auftrennung der chymotryptischen Peptide von B I (350 nMol) auf 0,8 x 150 cm Sephadex G-50 f in 30 % Essigsäure (1,8 ml/h).

Eine erste Fraktionierung der chymotryptischen Peptide erfolgte auf Sephadex G-50 in 30 % Essigsäure (Abb. 14). Die 9 Fraktionen A-I wurden jeweils auf QAE-Sephadex weiter aufgetrennt. Erwartungsgemäß konnte das komplexe Peptidgemisch durch diese beiden Trennverfahren nicht vollständig in reine Peptide aufgelöst werden. In solchen Fällen wurde eine präparative Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgelplatten angeschlossen.

Abb. 15. zeigt als Beispiel für die Isolierungstechnik die Anionenaustausch-Chromatographien der Gelfractionen E und F. Die genaue Verteilung der Peptide unter den Elutionsgipfeln wurde durch analytische Dünnschicht-Chromatographie bestimmt. Bei teilweise überlappenden Peptidfraktionen wurden die reinen Peptide aus den Flanken geschnitten (z.B. C 8 aus der Gelfraktion E). Wo dies nicht möglich war, wurden die Peptide durch präparative Dünnschicht-Chromatographie isoliert, wie z.B. die chymotryptischen Peptide: C 4, C 5, C 8a, C 9b, C 10a, C 10b, C 12a, C 13 und C 13a in Abb. 15.F.

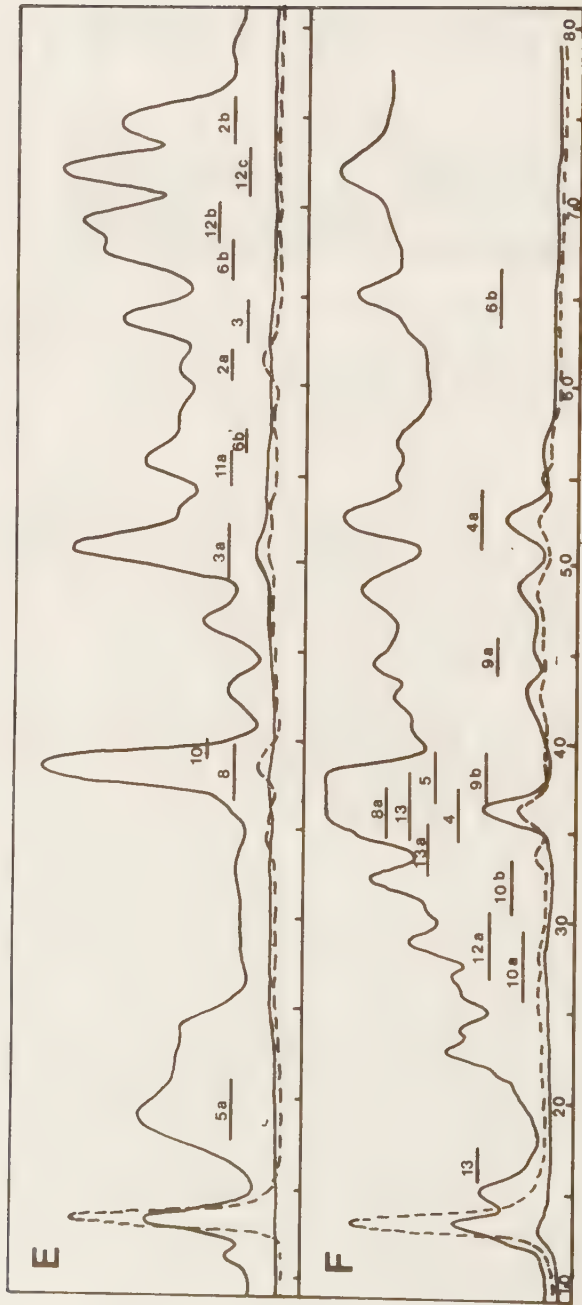


Abb. 15. Anionenaustausch-Chromatographie der Gelfraktionen E und F aus der chymotrypsinischen Spaltung (Abb. 14).

0,1 x 100 cm QAE-Sephadex A-25, äquilibriert mit 25 mM AHC pH 8,8. Elution mit einem linearen Konzentrationsgradienten bis 1 M AHC. Elutionsprofile bei 225 nm, 280 nm, 253 nm (gestrichelt). Die Striche unter den Elutionsprofilen bezeichnen die Lage der Peptide aufgrund der analytischen und präparativen Dünnschicht-Chromatographie, der Endgruppenbestimmung mit der Dansyl-Technik und der Aminosäureanalysen.

Dabei erwies sich die Anfärbung der Peptide mit Fluorescamin als vorteilhaft. Da nur ein geringer Teil des Peptids an der Oberfläche der Peptidbande mit Fluorescamin reagiert, können die Peptide nach Elution analysiert und sequenziert werden (48). Die bei der Elution aus der Kieselgelplatte erzielten Ausbeuten lagen zwischen 5-70 %. Die für die Verknüpfung der tryptischen Peptide verwendeten chymotryptischen Peptide sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Die meisten dieser Peptide konnten allein durch ihre Aminosäureanalyse und ihre Endgruppe den tryptischen Peptiden zugeordnet werden. Deshalb lieferten auch Fragmente mit geringer Spaltungsausbeute nützliche Informationen zur Aneinanderreihung der tryptischen Peptide. Die Peptide C 8, C 9, C 11 mußten zusätzlich sequenziert werden, weil die Aminosäurezusammensetzung allein keine eindeutige Zuordnung erlaubte.

Die Peptide C 9 und C 11 wurden über ihre beiden Lysine an DITC-Glas angekoppelt und bis zum letzten Ankerpunkt (bei beiden Lysin in Position 9) automatisch sequenziert. Der bei der Cyclisierung des letzten Lysins vom Träger abgelöste Peptidrumpf, wurde als freies Tri- bzw. Dipeptid aufgefangen und mit der Dansyl-Edman-Methode manuell sequenziert:

	← Solid-Phase →	← Manuell →
	9	12
C 9	Ile-Gly-Lys-Ile-Cys-Glu-Asp-Ile-Lys-Gly-His-Leu	
C 11	Ile-Lys-Gly-Val-AsN-Glu-Gly-Pro-Lys-Gly-Leu	

Tabelle 4. Aminosäureanalysen der chymotryptischen Peptide von B I

	C2	C2a	C2b	C3	C3a	C4	C4a	C4b	C5	C5a	C6	C6b	C6b'	C7	C8
Asp	1,12	1,02	1,04	1,98	1,12		1,13	1,12			4,11	2,13	2,22		0,14
Thr	0,14			1,76	1,72		0,18	0,87				0,16	0,11		0,16
Ser	0,11	0,13	0,17		0,17		0,15	0,19				0,19	0,13		0,18
Glu	2,09	1,86	2,26	3,02	2,19		1,18	2,22				0,17	0,20		1,22
Pro									0,95	0,88	3,21				0,94
Gly	1,89	2,11	2,09	0,19	0,16		0,19	0,22	1,05	1,09	0,19	0,18	0,22		0,18
Ala	0,07	0,19	0,13	0,11	0,11		0,12	0,19		0,13	4,77 ^{a)}	3,75	3,72		0,16
Val	0,87		0,78	0,08 ^{a)}	1,01	0,89	0,94			0,09	4,52 ^{a)}		0,16		1,68 ^{a)}
Ile	0,96	0,97	0,96	1,65	1,57		0,17	0,06		0,14	1,06	0,99	1,07	0,99	0,15
Leu	0,96	1,02					0,16	0,11	1,01	1,90	2,15	1,02	1,07		0,15
Tyr						0,99	0,86	0,76							
Phe	0,92		0,93											1,01	0,91
Lys	2,08	1,92	1,12			1,01	0,98	0,99		1,16	2,12		0,94		0,16
His				0,99	1,03			1,05	1,02	0,87					1,02
Gesamt	11	9	9	10	8	3	5	8	4	6	22	8	9	2	6
N-Term. b)	Val	Glu	Val	Thr	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Leu	Lys	Ala	Lys	Ile	Val
c)	DC	DC	-	DC	DC	DC	-	DC	DC	DC	-	-	DC	-	-

	C8a	C9	C9a	C9b	C10	C10a	C10b	C11	C11a	C12	C12a	C12b	C12c	C13	C13a
CM-Cys		0,93													
Asp		0,98			1,14	1,02		1,05	1,15	0,22		0,11		0,05	0,13
Ser					0,97	0,11	0,94		0,19	1,03		0,95	0,96	0,17	0,19
HSe														0,89	0,92
Glu		1,01	0,07		0,18			1,02	1,06	1,95		2,00	1,99	0,12	0,15
Pro	1,11							0,85	1,00					0,92	0,92
Gly		2,18	0,94	0,88	1,15	0,11	1,00	2,77	2,67	1,23		1,09	1,05	0,99	1,04
Ala			0,08		1,88	0,98	0,93		0,22	0,20			0,08		0,19
Val	1,69		0,07		0,14			0,82	0,92	0,81		0,89	0,88		0,14
Ile		2,74			1,82		1,75	1,17	0,12	1,83		1,84	1,79	1,11	1,06
Leu		1,00	1,06		1,04		1,07	0,91	1,00	2,05	0,89	0,99			0,98
Lys		1,94			1,12	0,92	0,14	2,12	1,04	0,96	1,11				
His	1,04	1,07	1,02	1,22	0,13					0,96		1,18	1,06		
Gesamt	4	12	3	2	9	3	6	11	9	11	2	9	8	4	5
N-Term. b)	Val	Ile	Gly	Gly	Lys	Lys	Ala	Ile	Gly	Lys	Lys	Ile	Ile	Gly	Leu
c)	DC	-	DC	DC	DC	DC	-	DC	DC	DC	DC	DC	-	DC	-

a) bestimmt nach 120 h Hydrolyse

b) Dansyl-Methode

c) DC = Die Peptide wurden zusätzlich durch präparative Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel getrennt (siehe 2.3.1.)

In beiden Fällen standen nur ca. 30 nMol zur Ankopplung an den Träger zur Verfügung. Die PTH-Ausbeuten im 1. Abbauschritt lagen unter 10 nMol. Derartig kleine Mengen konnten mit den hier benutzten Methoden eindeutig identifiziert werden. Bei der quantitativen Massenspektrometrie können durch Aufsummierung des gesamten Ionenstroms noch bis 50 Picomol bestimmt werden. Die Empfindlichkeit der Gaschromatographie wurde durch die Verwendung eines schwefelspezifischen flammenphotometrischen Detektors (FPD) (56) gegenüber dem früher verwendeten Flammenionisations-Detektor (FID) beträchtlich gesteigert. Der FPD ist weitgehend unempfindlich gegen nicht schwefelhaltige Verunreinigungen und es tritt kein störendes "Tailing" auf. Die Nachweisgrenze für einige PTHs liegt bei 1 Picomol.

Das lysinfreie chymotryptische Peptid C 8 wurde manuell mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert:

	1	2	3	4	5	6
C 8	Val	-Val	-Pro	-His	-Gln	-Phe

2.3.2. Peptide durch Spaltung mit *Staphylococcus aureus*-Protease

Die von Drapeau aus *Staphylococcus aureus* isolierte Protease spaltet spezifisch am Carboxylende von Glutaminsäure (54,55). Da B I 9 Glutaminsäure-Reste enthält, wurde eine Spaltung mit diesem Enzym versucht. Durch Gel- und Ionenaustausch-Chromatographie konnten 6 reine

Tabelle 5. Aminosäureanalysen der Peptide aus der Spaltung mit *Staphylococcus aureus*-Protease

	SA 1	SA 1a	SA 2	SA 3	SA 4	SA 4a
Asp			0,98	1,09		
Thr			0,98	0,97		
Ser						0,12
Hse					0,92	0,89
Glu	1,11	2,03	2,04	2,12	0,99	0,12
Pro					0,96	0,99
Gly			2,00	0,09	2,12	1,13
Ala						0,07
Val	0,93	0,91			0,82 ^{b)}	
Ile			0,96	1,69 ^{b)}	1,79 ^{b)}	0,97
Leu			1,00		0,97	1,04
Trp	(1) ^{a)}	(1) ^{a)}				
Tyr						
Phe	0,96	1,06				
Lys			2,12			
His				1,07	1,03	0,97
Gesamt	4	5	10	7	10	6
N-Term.	Trp	Trp	Glu	Ile	Val	His

a) spektrophotometrisch bestimmt nach (32,33)

b) bestimmt nach 120 h Hydrolyse

Peptide isoliert werden (Tabelle 5). Daneben entstehen uneinheitliche große Fragmente, die noch Glutaminsäure enthalten und etwa aus dem Bereich zwischen Position 22-96 stammen dürften. Die Glutaminsäuren in den Positionen 65 und 86 erwiesen sich auch nach sorgfältigen Analysen (Aminopeptidase M) als Säuren und nicht als Amide.

2.3.3. Reihenfolge der tryptischen Peptide

Die Tabelle 6 zeigt die Reihenfolge der tryptischen Peptide, die sich aus der Zuordnung der Überlappungspeptide eindeutig ergibt. Die Überlappung erfolgt fast ausschließlich durch chymotryptische Fragmente. Die Fragmente aus der Staphylococcus aureus-Spaltung treten lediglich im Bereich der tryptischen Peptide T 1 - T 3 und in T 12 auf. Das große Mittelstück von AsN 22 bis Glu 96 wird offenbar kaum gespalten (siehe 2.3.2.).

Durch die chymotryptische Spezifität der verwendeten Enzympräparation an TPCK-Trypsin tritt bei der tryptischen Verdauung hinter Phe 53 eine Spaltung auf, für die kein chymotryptisches Überlappungspeptid besteht. Der Sequenzabschnitt 1-53 ist eindeutig überlappt und durch das N-terminale Trp sowie durch den Festphasen-Abbau des ganzen Peptids B I als N-terminales Teilstück charakterisiert. Position 93-106 ist durch sein endständiges Homoserin als C-Terminus definiert.

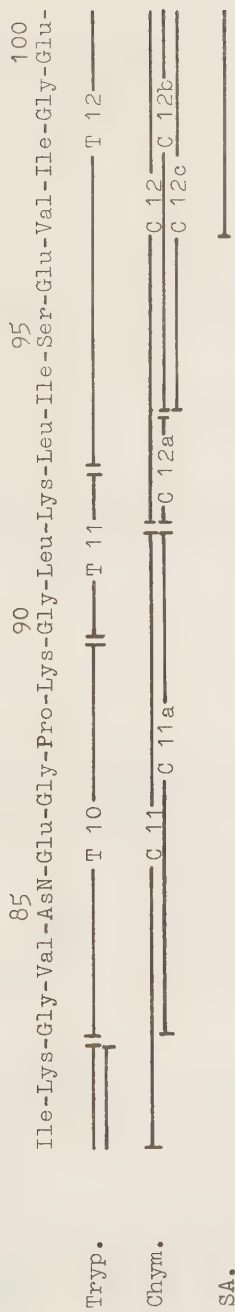
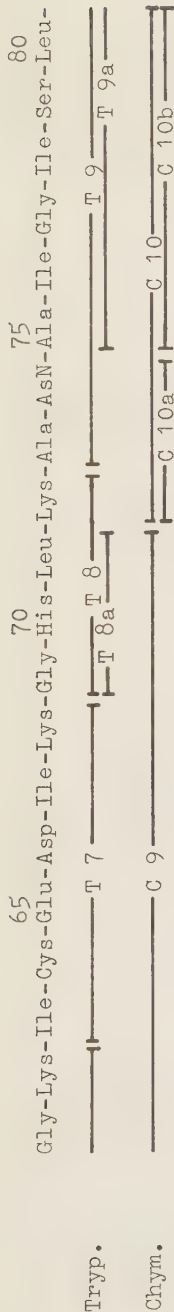
Die 2 dazwischenliegenden Teilsequenzen: Val 54 - Lys 72 (T 6b - T 8) und Ala 73 - Lys 92 (T 9 - T 11) sind in sich ebenfalls eindeutig bestimmt. Die Lage dieser Teilstücke in der Gesamtsequenz ergibt sich durch die chymotryptischen Fragmente C 10 und C 12, durch die jeweils nur mit Lysin endende Stücke verknüpft werden können.

Eine umgekehrte Reihenfolge der beiden mittleren Teilstücke T 9 - T 11 und T 6b - T 8 würde zu den Sequenzen: -Phe-Ala-AsN- und -Lys-Val-Val-Pro-His-Gln-Phe- führen, die durch das Auftreten der chymotryptischen Fragmente C 10 : Lys-Ala-AsN-..... und C 8 : Val-Val-Pro-His-Gln-Phe ausgeschlossen werden.

Die Richtigkeit dieser Betrachtungen setzt voraus, daß kein weiteres tryptisches Peptid mit C-terminalem Lysin fehlt. Diese Möglichkeit ist jedoch äußerst unwahrscheinlich, da:

1. alle 11 Lysine der Bruttoanalyse in verschiedenen tryptischen Peptiden gefunden wurden und
2. eine lückenlose Aufarbeitung der vollständig löslichen tryptischen Spaltprodukte erfolgt ist.

Die Positionen 1-42 wurden zusätzlich durch den automatischen Abbau des mit 4-Sulfophenyl-isothiocyanat (28) derivatisierten Bromcyanpeptids B I im Beckman Liquid-Phase-Sequencer (57) bestätigt. (Dr.Fietzek im MPI für Biochemie, München-Martinsried).



¹⁰⁶
 His-Leu-Gly-Ile-Pro-Met
 Tryp. ————
 Chym. ———— C 13 ————
 SA. ———— C 13a ————
 ———— SA 4 ———— SA 4a ————

Tryp. = tryptische Peptide (T)
 Chym. = chymotryptische Peptide (C)
 SA. = Peptide aus der Spaltung mit der
 Protease aus *Staphylococcus aureus*
 SP. = automatische Sequenzierung des un-
 gespaltenen Bromcyanpeptids B I
 mit der Solid-Phase-Methode

C. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Analytische Methoden

1.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (15 % Polyacrylamid) bei pH 8,0 wurden nach (21) durchgeführt. An beiden Rändern der Gelplatten wurde Cytochrom c als Markersubstanz aufgetragen. Die Peptidbanden wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt und bei 578 nm densitometriert.

1.2. Aminosäureanalysen

Die Peptide (1-3 nMol) wurden in 200 µl 5,7 N HCl (3 x destilliert) in evakuierten (1 Torr), abgeschmolzenen Glasröhrchen 24 h bei 105 °C hydrolysiert. Längere Hydrolysezeiten bis zu 120 h bei Peptiden mit Val-Val-, Val-Ile- und Ile-Ile-Bindungen sind in den Tabellen vermerkt. Die Hydrolysate wurden im Vakuum eingetrocknet und mit dem im Institut gebauten Aminosäureanalysator (58,59) bestimmt.

1.3. Bestimmung der N-terminalen Aminosäure mit der Dansyl-Technik

0,2-1 nMol Peptid werden im Glasröhrchen (0,3x5 cm) eingetrocknet. Der Rückstand wird in 10-20 µl 0,2 M NaHCO₃ (pH 9) aufgenommen und erneut eingetrocknet. Dann wird

die Probe mit 10 µl frisch bereiteter Dansylchloridlösung (die Stammlösung von 2,5 mg/ml in Aceton wird 1:1 mit H₂O verdünnt) 30 min bei 45 °C inkubiert und wieder eingetrocknet. In 40 µl 5,7 N HCl wird nach Abschmelzen unter Vakuum 6 h bei 105 °C hydrolysiert.

Zur Identifizierung wird das Hydrolysat eingetrocknet und in 5 µl 95 % Äthanol aufgenommen. Jeweils 1 µl der Probe wird auf beidseitig beschichtete Polyamidplatten (5 x 5 cm, F 1700 Mikropolyamid von Schleicher & Schüll) aufgetragen und nacheinander in folgenden Fließmitteln chromatographiert:

- I. 1,5 % Ameisensäure
dann senkrecht zur ersten Laufrichtung in:
- II. Toluol/Eisessig (100 %) 10:1, v/v und
- III. Äthylacetat/Methanol/Eisessig 20:1:1, v/v/v.

Zur Unterscheidung von ε-N-Dansyl-Lys, α-N-Dansyl-His und α-N-Dansyl-Arg wird anstelle von Fließmittel I zuerst 1,5 % Ammoniak benutzt.

Die Identifizierung der im UV-Licht fluoreszierenden Flecken erfolgt durch Vergleich mit einem auf der Rückseite chromatographierten Testmix aller Dansyl-Aminosäuren.

1.4. UV-Absorptionsspektren

UV-Spektren im Bereich von 220-360 nm wurden an einem Beckman DK-2A Spektrophotometer in 1x1 cm Quarzküvetten aufgenommen.

Aus den Spektren wurde der Tryptophan- und Tyrosingehalt sowie die Zahl der Citraconyl-Reste berechnet, wobei die in (32,33 und 60) angegebenen Extinktionskoeffizienten benutzt wurden.

1.5. Radioaktivitätsmessung

5-50 μ l Peptidlösung wurden in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (6 g Permablend III, Packard, 600 ml Toluol und 400 ml Äthylenglykol-monomethyläther) pipetiert und die Radioaktivität im Packard-Tricarb-Szintillationszähler gemessen.

2. Peptidtrennung

2.1. Säulenchromatographie

Zur Gelchromatographie nach den Modifizierungsreaktionen im präparativen Maßstab wurden kurze 2-5 x 50-70 cm-Säulen verwendet. Das Eluat wurde bei 280 nm im Durchflußphotometer (Uvicord II, LKB) gemessen und im Fraktionssammler (Uvicord Ultrorac) aufgefangen.

Die Peptide wurden mit dem im Institut entwickelten System getrennt, das sich sowohl für analytische als auch für präparative Mengen eignet (20 nMol-1 μ Mol) (61,62).

Für die Gelchromatographie wurden Säulen von 0,3-0,8 x 150 cm und für die Ionenaustausch-Chromatographie Säulen von 0,1 x 100 cm bzw. 0,3 x 150 cm benutzt. Die verwendeten Gele und Ionenaustauscher sowie die Elutionsbedingungen sind jeweils den Legenden zu den entsprechenden Abbildungen bzw. dem Ergebnis-Teil zu entnehmen.

Die Säulen wurden volumenkonstant mit Kolbenspritzenpumpen eluiert (0,27-1,8 ml/h bei der Gel- und mit 0,39 bzw. 2,46 ml/h bei der Ionenaustausch-Chromatographie).

Das Säuleneluat wird in Durchflußküvetten (8 μ l) durch 2 hintereinandergeschaltete Photometer geleitet:

1. ein Spektralphotometer mit Deuteriumlampe, dessen Monochromator auf 225 nm eingestellt ist;
2. ein Eppendorf Photometer mit Quecksilberdampflampe, dessen Monochromator zwischen den zwei Wellenlängen 280 nm und 253 nm wechselt.

Für stark UV-absorbierende Elutionsmittel, wie 30 % Essig- oder Ameisensäure, wurde anstelle des Spektralphotometers (225 nm) ein Durchfluß-Differentialrefraktometer eingesetzt.

Die 30 min-Fractionen wurden in 1,5 ml-Einmal-Plastik-Reaktionsgefäßen gesammelt und bei Volumina unter 0,5 ml im Exsikkator eingetrocknet. Größere Volumina wurden lyophilisiert oder einrotiert.

2.2. Dünnschicht-Chromatographie

Zur analytischen Charakterisierung wurden Aliquote der Säulenfraktionen (0,1-1 nMol) in 1-10 μ l nebeneinander auf Kieselgel-Fertigplatten (Merck, ohne Fluoreszenzindikator, 0,25 mm Schichtdicke, 20 x 20 cm) aufgetragen und aufsteigend in Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) 2:2:1, v/v/v chromatographiert. Nach 30 min Trocknen bei 100 °C wurden die Platten mit einer 0,003 %-igen Lösung von Fluorescamin (Fluram p.A., Serva) in Aceton bepinselt und nach 10 min im UV bei 350 nm betrachtet (47,48).

Zur präparativen Dünnschicht-Chromatographie wurden die eingetrockneten Peptidfraktionen (bis 50 nMol) in 10-30 μ l gelöst und in 2 cm langen Strichen auf Kieselgelfertigplatten (siehe oben) im Abstand von 1-1,5 cm aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte wie oben, ebenso das Trocknen und die Anfärbung der Peptide mit Fluorescamin. Die fluoreszierenden Banden wurden ausgekratzt

und aus dem Kieselgel mit 2 x 1 ml 20 % Methanol und mit 1 x 1 ml 10 % Essigsäure eluiert.

3. Modifizierungsreaktionen

3.1. Carboxymethylierung

13 μ Mol GDH-Untereinheit wurden in 30 ml 6 M Guanidin/HCl (Serva, p.A.), 0,2 M Tris/HCl pH 8,2; 5 mM EDTA gelöst und 1 h bei 37 °C unter N₂ mit Dithioerythrit (DTE, Serva, p.A., im molaren Verhältnis 1:3 zu den SH-Gruppen des Proteins) reduziert.

Die Carboxymethylierung erfolgte mit einem 2-fachen molaren Überschuß an ¹⁴C-Jodessigsäure über alle SH-Gruppen im Dunkeln, 1 h bei 37 °C unter N₂. Dazu wurden 1 mCi 2-¹⁴C-Jodessigsäure (Amersham, 51 μ Ci/ μ Mol) mit unmarkierter Jodessigsäure (aus n-Hexan frisch umkristallisiert) auf 2,24 μ Ci/ μ Mol verdünnt.

Nach der Reaktion wurde die überschüssige Jodessigsäure mit DTE abgesättigt und das modifizierte Protein durch Chromatographie an Sephadex G-50 in 80 % Ameisensäure isoliert.

3.2. Umsetzung mit 4-Sulfophenylisothiocyanat

0,5 μ Mol Bromcyanpeptid B I wurden in 0,5 ml Pyridin/H₂O/Triäthylamin (5:5:1) mit einem 10-fachen molaren Überschuß an 4-Sulfophenylisothiocyanat über alle Aminogruppen umgesetzt. Nach 5 h Reaktion unter N₂ bei 52 °C wurde einrotiert und im Ölvakuum getrocknet.

Um eine Blockierung der derivatisierten N-terminalen Aminosäure durch oxidative Desulfurierung zu vermeiden, wurde diese mit 0,5 ml H₂O-freier TFA (30 min, 45 °C)

cyclisiert und als 4-Sulfo-anilino-thiazolinon-Derivat abgespalten. Die Lösung wurde einrotiert, im Ölvakuum getrocknet und an Sephadex G-50 0,1 M AHC chromatographiert.

3.3. Citraconylierung

3 μ Mol Peptidgemisch B I und B II wurden in 6 ml 6 M Guanidin/HCl (Serva, p.A.), 0,22 M Natrium-pyrophosphat pH 8,5 mit einem 40-fachen Überschuß an Citraconsäureanhydrid (Eastman) über alle Aminogruppen umgesetzt. Das Anhydrid wurde in 4 Portionen in Dioxan gelöst zupipettiert und der pH-Wert am pH-Stat mit 5 N NaOH konstantgehalten. Das Gemisch wurde an Sephadex G-50 in 0,1 M AHC pH 8,6 chromatographiert.

4. Spaltungen

4.1. Bromcyanspaltung

10 μ Mol carboxymethylierte GDH-Untereinheit wurden in 20 ml 75 % Ameisensäure mit einem 100-fachen Überschuß an Bromcyan (Serva, reinst) über alle Methionine 24 h gespalten. Der Spaltansatz wurde einrotiert und in 4 Portionen auf Sephadex G-50 fine (1,2 x 200 cm, 30 % Ameisensäure, 4,5 ml/h) chromatographiert.

4.2. Enzymatische Spaltungen

4.2.1. Tryptische Spaltung

Das Bromcyanpeptid B I wurde etwa 1 %-ig in 0,1 M AHC pH 8,0 suspendiert und mit 3 % (w/w) TPCK-Trypsin (vom Rind, Merck) 3 h bei 37 °C gespalten. Anschließend

wurde sofort lyophilisiert.

Zur selektiven Spaltung des argininhaltigen Bromcyan-peptids B II aus dem citraconylierten Peptidgemisch B I und B II wurden nur 0,3 % (w/w) TPCK-Trypsin eingesetzt, da die Peptide B I und B II etwa im Verhältnis 9:1 im Gemisch enthalten waren. Die Citraconyl-Schutzgruppe wurde über Nacht in 30 % Essigsäure wieder abgespalten.

4.2.2. Spaltung mit Clostripain

In einem analytischen Versuch wurden 1 mg des nicht citraconylierten Peptidgemisches B I und B II in 45 mM Natrium-phosphat-Puffer pH 7,7 in Gegenwart von 1 mM DTE mit 0,01 mg der argininspezifischen Protease Clostripain (Boehringer Mannheim) 4 h bei 37 °C gespalten.

4.2.3. Chymotryptische Spaltung

350 nMol B I, suspendiert in 0,35 ml 0,1 M AHC pH 8,0, wurden mit 1 % (w/w) TLCK- α -Chymotrypsin (Worthington) 6 h bei Raumtemperatur gespalten und die Reaktion dann durch Ansäuern auf pH 2 gestoppt. Die Reaktionsbedingungen wurden aufgrund der Ergebnisse der Spaltungskinetik (vgl. Ergebnis-Teil 2.3.1.) so gewählt.

4.2.4. Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease

250 nMol B I wurden in 0,4 ml 50 mM Ammonium-acetat-Puffer pH 4,0 bei 37 °C mit 3,5 % (w/w) Protease aus Staphylococcus aureus (Miles) versetzt und 18 h lang inkubiert.

Analytische Spaltungsversuche mit je 50 nMol B I wurden in 50 mM AHC pH 7,8 und Natrium-phosphat-Puffer pH 7,8 ausgeführt (54,55).

4.2.5. Spaltung mit Aminopeptidase M

2-4 nMol Peptid wurden in 30 µl 0,1 M N-Äthyl-morpholin-acetat-Puffer pH 8,0 gelöst und 100 % (w/w) Aminopeptidase M in 10 µl Puffer zugesetzt. Nach 24 h bei 37 °C wurde der Spaltungsansatz eingetrocknet und am Aminosäureanalysator untersucht.

5. Sequenzierung

5.1. Dansyl-Edman-Abbau

10-50 nMol Peptid werden in 0,1 ml H₂O aufgelöst und ein Aliquot von 0,5-1 nMol zur Identifizierung der N-terminalen Aminosäure mit der Dansyl-Technik (vgl. C.1.3.) entnommen. Dann wird 0,1 ml 5 % Phenylisothiocyanat (Fluka puriss.p.A.) in Pyridin zugegeben, N₂ eingeleitet und 1 h bei 45 °C inkubiert. Nach dem Eintrocknen (Ölvakuum, 60 °C) wird mit 0,2 ml H₂O-freier Trifluoressigsäure (TFA, dest. über CrO₃ und aus H₂SO₄ konz. redestilliert) 30 min bei 45 °C cyclisiert und die TFA im Ölvakuum (30 min) wieder abgezogen.

Es werden 0,2 ml H₂O zugesetzt, und das abgespaltene Thiazolinon zusammen mit anderen Reaktionsprodukten mit 3 x 2 ml H₂O-gesättigtem n-Butylacetat extrahiert. Bei apolaren Peptiden wird Benzol zur Extraktion verwendet. Das in der wässrigen Phase zurückbleibende Peptid wird eingetrocknet.

Mit der Aufnahme des Peptids in Wasser und der Entnahme des Aliquots für die Dansylierung beginnt der nächste Abbaucyclus.

5.2. Sequenzierung nach der Solid-Phase-Methode

5.2.1. Herstellung von APG- und DITC-Glas

Porenkontrolliertes Glas CPG-10-75 (Serva) wird mit 4 % 3-Aminopropyl-triäthoxysilan (Pierce) in Aceton inkubiert. Nach dem Abdampfen des Acetons wird die Umsetzung wiederholt. Das Glas-Derivat wird mit Aceton und Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

DITC-Glas entsteht durch Umsetzung von trockenem APG mit einer gesättigten Lösung von DITC in DMF.

5.2.2. Ankopplungsreaktionen

Homoserinlactonkopplung:

Das Homoserinpeptid wird mit H_2O -freier TFA 2-mal 30 min bei 37 °C lactonisiert und im Exsikkator getrocknet. Nach Auflösen in 0,5 ml DMF werden 180 mg trockenes APG und 50 µl TAA zugegeben. Der Ansatz wird 3 h bei 56 °C inkubiert.

Kopplung an DITC-Glas:

Lysinhaltige Peptide (30-200 nMol) werden zunächst mit H_2O -freier TFA 30 min bei 37 °C inkubiert und eingetrocknet. Nach Auflösen in 0,5 ml DMF (oder, wenn darin nicht löslich, z.B. in 60 % Pyridin) werden 180 mg trockenes DITC-Glas und 50 µl TAA zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur leicht gerüttelt.

Die beladenen Träger werden mit DMF, H_2O und Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Bestimmung der Ankopplungsausbeuten:

- a) Bei radioaktiven Peptiden durch Bestimmung der Radioaktivität im Kopplungsansatz und in den gesammelten Waschflüssigkeiten.
- b) Bei den übrigen Peptiden durch Aminosäureanalyse eines hydrolysierten Aliquots des Trägers.

5.2.3. Automatischer Abbau im Solid-Phase-Sequencer

Die trägergebundenen Peptide wurden mit dem im Institut gebauten Solid-Phase-Sequencer automatisch sequenziert, wobei der in (38) beschriebene Abbaucyclus verwendet wurde.

5.2.4. Aufarbeitung der Thiazolinone

Die im Sequencer gesammelten Thiazolinon-Fractionen (TFA) wurden getrocknet, in 50 μ l 1 N HCl 10 min bei 80 °C konvertiert und auf 1x2 cm-Säulen mit Dowex 50 aufgetragen, die mit einigen ml Methanol eluiert wurden. Das Eluat wurde einrotiert, in 1,5 ml-Plastik-Reaktionsgefäße übertragen und im Vakuum eingetrocknet. Zur Gaschromatographie und Dünnschicht-Chromatographie wurden die Proben in 20-100 μ l Essigsäureäthylester gelöst, zur Abfüllung für die Massenspektrometrie in Methanol.

5.2.5. Identifizierung der PTHs

Zur Gaschromatographie wurde ein Beckman GC-45 (Flammenionisationsdetektor) oder ein Shimadzu GC-6A (schwefelspezifischer flammenphotometrischer Detektor)

benutzt. Trägergas: Helium; Brenngase: Wasserstoff/Luft. Die Trennung erfolgte in 0,2 x 90 cm-Glassäulen (on-column-injection) an PTH-Chromosorb (Serva) durch isotherme Läufe bei 190 °C (PTH-Ser, -Gly, -Val, -Thr, -Pro, -Ile und -Leu) und 240 °C (PTH-Met, -Phe, -Tyr, -Trp, -GluOCH₃). Als interner Standard wurde PTH-Norleucin verwendet. Zur quantitativen Auswertung wurden die Peaks planimetriert.

Die massenspektrometrische Identifizierung der PTHs erfolgte mit einem Quadrupol-Massenspektrometer Finnigan 3200. Beim manuellen Betrieb wurden die über den Festprobeneinlaß eingeführten trockenen Proben durch Aufheizen auf rd. 200 °C innerhalb einiger Minuten verdampft und mit Isobutan oder Methanol chemisch ionisiert. Charakteristische Spektren im Massenbereich 160-330 wurden mit einem UV-Schreiber registriert.

Beim Computer-Betrieb wird das Massenspektrometer von einem Prozeßrechner (Texas Instruments Typ 960 A) gesteuert. Der integrierte Ionenstrom für 32 vorgewählte Massen wird von einem Thermodrucker in Form von Tabellen ausgegeben.

Zur Dünnschicht-Chromatographie von PTHs auf doppelseitig beschichteten Polyamidplatten (DC-Fertigfolien F 1700 Mikropolyamid von Schleicher & Schüll) wurde das in (43) beschriebene System verwendet. Zum Nachweis dient die Lösung eines dem ersten Fließmittel zugesetzten Fluoreszenzindikators.

Zur Rückhydrolyse wurden entsprechende Aliquote der Thiazolinon- oder PTH-Fraktionen mit 0,2 ml 57 % HJ in abgeschmolzenen Glasröhrchen 20 h bei 127 °C hydrolysiert. Nach dem Trocknen im Vakuum wurde der in Natriumcitrat-Puffer (pH 2,2) lösliche Überstand zur Aminosäureanalyse aufgetragen.

D.

DISKUSSION

Das im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte Bromcyanfragment der GDH besteht aus 106 Aminosäuren und ist somit von der Größe des Cytochrom c. Dieses Fragment besitzt einen freien N-Terminus. Deshalb wurde zunächst versucht, das ungespaltene Peptid möglichst weit automatisch zu sequenzieren. Bei Verwendung von porösem Glas als Trägermatrix können mit der Solid-Phase-Methode auch größere Peptide und Proteine sequenziert werden. Die Ankopplung über ein C-terminales Homoserin oder über die ϵ -Aminogruppen der Lysinreste bereitet im allgemeinen keine Schwierigkeiten, wenn das Peptid bzw. Protein löslich ist (38,39). In diesem speziellen Fall war das Bromcyanpeptid unlöslich und wurde aus einer Suspension heraus mit ungewöhnlich geringer Ausbeute angekoppelt. Dennoch konnten die ersten 24 Positionen eindeutig sequenziert werden. Da eine Fragmentierung des 106 Aminosäuren langen Bromcyanpeptids ohnehin notwendig war, wurden aus Gründen der Materialersparnis keine weiteren Versuche zur Sequenzierung des ungespaltenen Peptids unternommen.

Mit der Solid-Phase-Methode können in der Regel Peptide über 30-40 Schritte vollständig sequenziert werden (38). Eine optimale Strategie wäre deshalb die Zerlegung des Bromcyanpeptids in wenige Spaltstücke dieser Größe. Leider boten sich dazu in diesem Fall keine überzeugenden Möglichkeiten. Die gebräuchlichste Methode zur Gewinnung größerer Fragmente, die Beschränkung der tryptischen Spaltung auf die Arginylbindungen, war hier nicht anwendbar, weil das Peptid kein Arginin enthält. Im Ergebnisteil nicht beschriebene Vorversuche zur selektiven Spaltung an den Tryptophanyl-, Tyrosyl- und

Histidylbinderungen mit N-Bromsuccinimid (70,71) sowie zur partiellen sauren Hydrolyse (72) wurden wegen der geringen Spaltungsausbeuten nicht weiter verfolgt. Auch die Ergebnisse von Kurzzeit-Spaltungen mit Trypsin bzw. Chymotrypsin (vgl. B.2.3.1.) und der Spaltung mit *Staphylococcus aureus*-Protease (vgl. B.2.3.2. und C.4.2.4.) ermutigten nicht zur präparativen Darstellung größerer Fragmente.

Deshalb wurde der klassische Weg der Isolierung der tryptischen Peptide beschritten. Durch Anionenaustausch- und Gelchromatographie auf Säulen kleinen Durchmessers konnten alle tryptischen Peptide isoliert werden, wobei die Menge des zur tryptischen Spaltung eingesetzten Bromcyanpeptids 800 nMol (9,2 mg) betrug. Das C-terminale tryptische Spaltpeptid wurde selektiv aus einem grob vorfraktionierten Gemisch heraus über sein Homoserinlacton an den festen Träger gebunden. Die Anwendung der Solid-Phase-Technik zur Fraktionierung von Peptidgemischen durch "kovalente Chromatographie" ist ein besonderer Vorteil dieser Methode (73). Leider besteht das hier so leicht zugängliche tryptische Peptid nur aus 14 Aminosäuren.

Trotz Verwendung von TPCK-behandeltem Trypsin erfolgten zwei Spaltungen mit chymotryptischer Spezifität, beide mit nahezu quantitativer Ausbeute. Dadurch ergaben sich zusätzliche Schwierigkeiten bei der Überlappung der tryptischen Peptide mit Hilfe chymotryptischer Fragmente (vgl. B.2.3.3.).

Die isolierten tryptischen Peptide sind zwischen 3 und 14 Aminosäuren lang. Solche Peptide wurden bisher vorwiegend mit der Dansyl-Edman-Technik (51) manuell se-

quenziert. Mit der Solid-Phase-Methode wurden hier die meisten dieser Sequenzen automatisch bestimmt. Dabei erwies es sich als Vorteil, daß alle "echten" tryptischen Peptide mit Lysin enden und über dieses an den aktivierten Träger angekoppelt werden konnten. Gegenüber der Dansyl-Edman-Technik liefert die Solid-Phase-Sequenzierung direkte Aussagen über die Amidfunktionen (Glutamin, Asparagin). Infolge der Möglichkeiten zur quantitativen Bestimmung der abgespaltenen PTHs sind die Anforderungen an die Reinheit der Peptide nicht so hoch wie bei der Dansyl-Edman-Methode. In einem Fall gelang die eindeutige Sequenzierung eines Peptids, das zu einem Drittel mit einem acidolytischen Spaltstück desselben Peptids verunreinigt war (vgl. B.2.2.4.1. und Abb. 12). Die zur Solid-Phase-Sequenzierung eingesetzten Peptidmengen von 50-200 nMol könnten in der Regel um den Faktor 5 vermindert werden, so daß diese automatische Methode auch hinsichtlich der Empfindlichkeit mit der manuellen Dansyl-Edman-Technik konkurrieren kann (vgl. B.2.3.1.). Wegen des geringeren Aufwands wurden Tri- und Tetrapeptide oft manuell sequenziert. Die meisten dieser kurzen Sequenzen wurden jedoch zusätzlich mit der Solid-Phase-Methode bestätigt.

Die Festlegung der Reihenfolge der tryptischen Peptide erfolgte durch geeignete chymotryptische Überlappungspeptide. Diese wurden mit der gleichen säulenchromatographischen Technik aufgetrennt wie die tryptischen Peptide, jedoch in Mengen von nur 350 nMol. In einigen Fällen mußte eine präparative Dünnschicht-Chromatographie angeschlossen werden. Für die Einordnung der chymotryptischen Fragmente in die Sequenzen der tryptischen Peptide genügten in den meisten Fällen die Aminosäurezusammensetzung und die Kenntnis der N-terminalen Aminosäure. Zur Sequenzierung von zwei chymotryptischen Peptiden wurde eine Kombination der automatischen Solid-

Phase-Methode mit der manuellen Dansyl-Edman-Technik angewendet (vgl. 2.3.1.). Dabei wurden diese Peptide über den nicht C-terminalen Lysinrest an den Träger gekoppelt und bis zu diesem automatisch sequenziert. Der C-terminale Peptidrest wurde aufgefangen und manuell sequenziert. Dadurch kann in geeigneten Fällen die problematischere C-terminale Kopplung von Peptiden (35, 39) umgangen werden.

Mit der Sequenzierung des größten Bromcyanpeptids liegen rund 30 % der GDH-Untereinheit als zusammenhängende Sequenz vor. Die Länge dieser Teilsequenz ermöglicht erste Vergleiche mit den bekannten Primärstrukturen anderer NAD-abhängiger Dehydrogenasen.

Beim systematischen Vergleich mit der LDH-Sequenz (Hundshai M_4) wurden keine eindrucksvollen Übereinstimmungen gefunden. Dies wäre nach den geringen Sequenzhomologien der Dehydrogenasen mit bereits bekannter Primärstruktur auch nicht zu erwarten (8). Lediglich in der Gegend von His 101 des Bromcyanpeptids besteht eine auffallende Ähnlichkeit zu dem Bereich der LDH mit dem am Katalysemechanismus beteiligten His 195 (9) sowie zu einem tryptischen Peptid aus der m-MDH, das nach Modifizierung eines reaktiven His im nativen Enzym mit Jodacetamid isoliert wurde (Abb. 16). Für die Beteiligung eines Histidinrestes am Katalysemechanismus der GDH sprechen auch die Ergebnisse von Modifizierungsexperimenten mit diazotiertem Aminotetrazol (74).

Eine weitere Ähnlichkeit besteht zwischen dem Abschnitt Val 36 - Lys 43 des Bromcyanpeptids B I und den Positionen 122-129 der LDH, die Teil der NAD-Bindungsdomäne sind (Abb. 17). Die Reste 118-130 bilden in der LDH den

helikalen Abschnitt αE , die Reste 131-136 den Faltblatt-Abschnitt βE . In Übereinstimmung damit läßt sich mit Hilfe der Regeln von Chou und Fasman (75) für den Bereich AsN 34 - Ala 48 des Bromcyanpeptids eine Helixstruktur (α) voraussagen, die von einer β -Faltblattstruktur (β) gefolgt wird.

Diese Homologie in der Sequenz und in der Konformation würde eine Zuordnung des GDH-Peptids zur Struktur der LDH-Untereinheit (M_4) ermöglichen. Demnach enthielte das Bromcyanpeptid einen Teil der GDH-Sequenz, der dem Übergangsbereich zwischen dem Nicotinamid-Abschnitt des Coenzym-Bindungsteils und dem Substrat-Bindungsteil (His 195) der LDH homolog ist (Abb. 18).

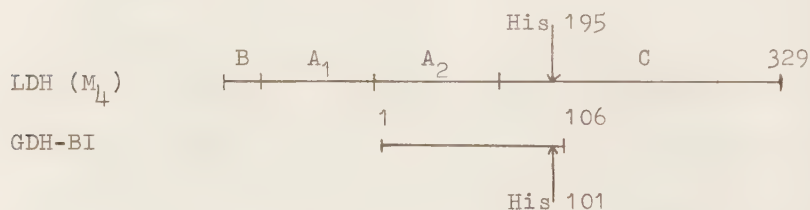


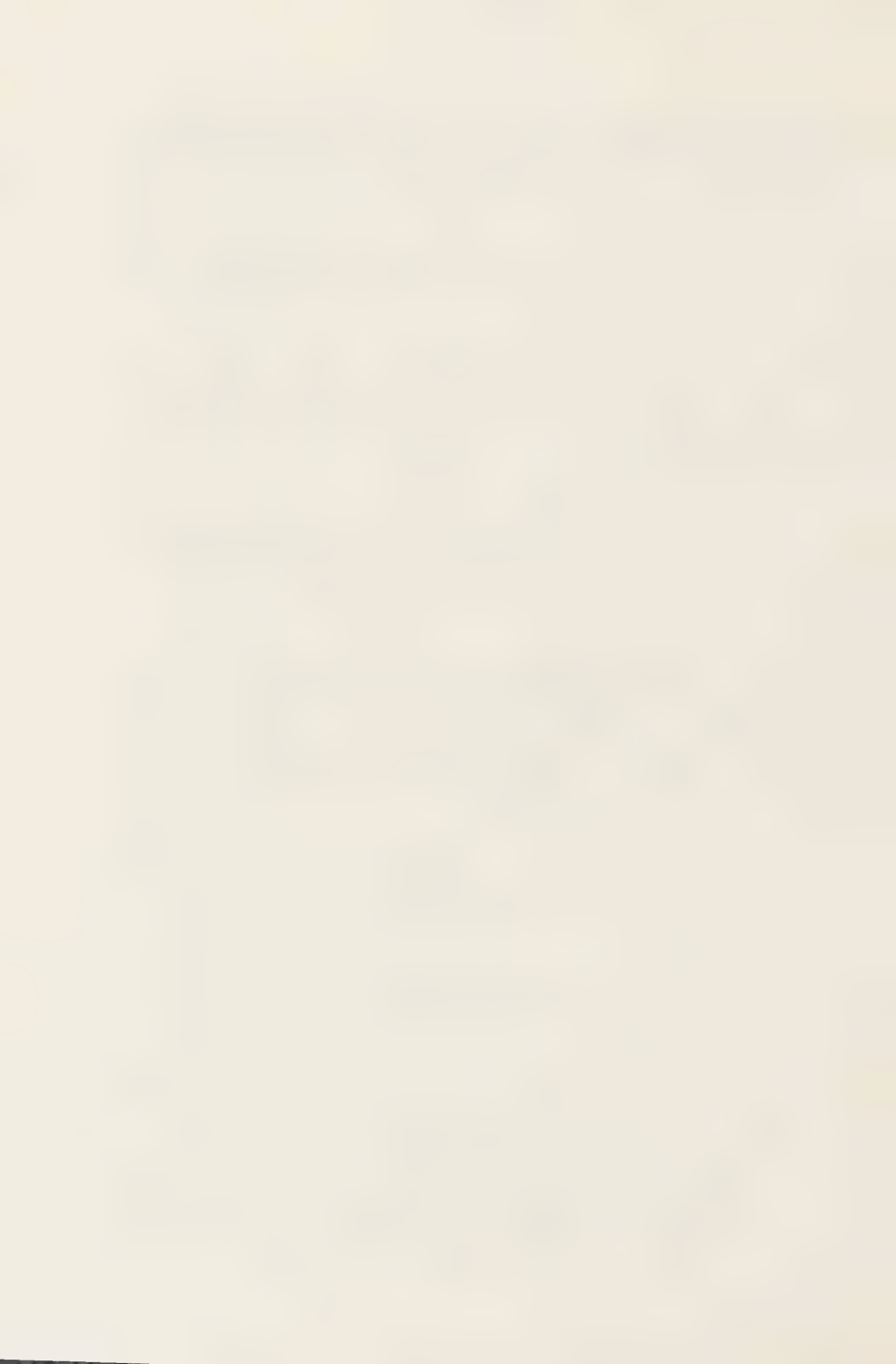
Abb. 18. A_1 = AMP-Mononucleotid-Bindungsteil,
 A_2 = Nicotinamid-Mononucleotid-Bindungsteil,
 die zusammen die NAD-bindende Domäne bilden;
 B = N-terminaler "Arm";
 C = Katalytische Domäne nach (8).

Eine ähnliche Zuordnung wäre zur MDH-Untereinheit möglich, wenn man annimmt, daß der Histidinrest in dem mit Jodacetamid isolierten tryptischen Peptid (s.o.) zum essentiellen His 195 der LDH homolog ist und die m-MDH eine zur s-MDH vergleichbare Raumstruktur besitzt.

Bei der ADH liegt die katalytische Domäne N-terminal von der Coenzym-Bindungsdomäne, so daß hier das GDH-Fragment nicht zugeordnet werden könnte.

Inzwischen sind rund 70 % der GDH sequenziert. Außerhalb dieser Arbeit sind in einem vor B I liegenden Bromcyanpeptid weitere Homologien zu den vorderen Teilen der NAD-Bindungsdomäne in der LDH gefunden worden. Nach B I einzuordnende Bromcyanpeptide zeigen keine auffallenden Homologien zur LDH, wie es für den Rest der katalytischen Domäne zu erwarten ist.

Diese Befunde lassen eine deutliche Homologie der GDH zur LDH und MDH im Sinne der Domänenhypothese erwarten. Bei allen drei Enzymen ist die Beteiligung eines Histidinrestes am Katalysemechanismus anzunehmen. Wahrscheinlich stimmen die Lagebeziehungen zwischen Coenzym-Bindungsdomäne und substratbindender Domäne überein. Die Fertigstellung der GDH-Sequenz und die geplante Röntgenstrukturanalyse werden diese phylogenetisch interessanten Aspekte weiter klären.



E.

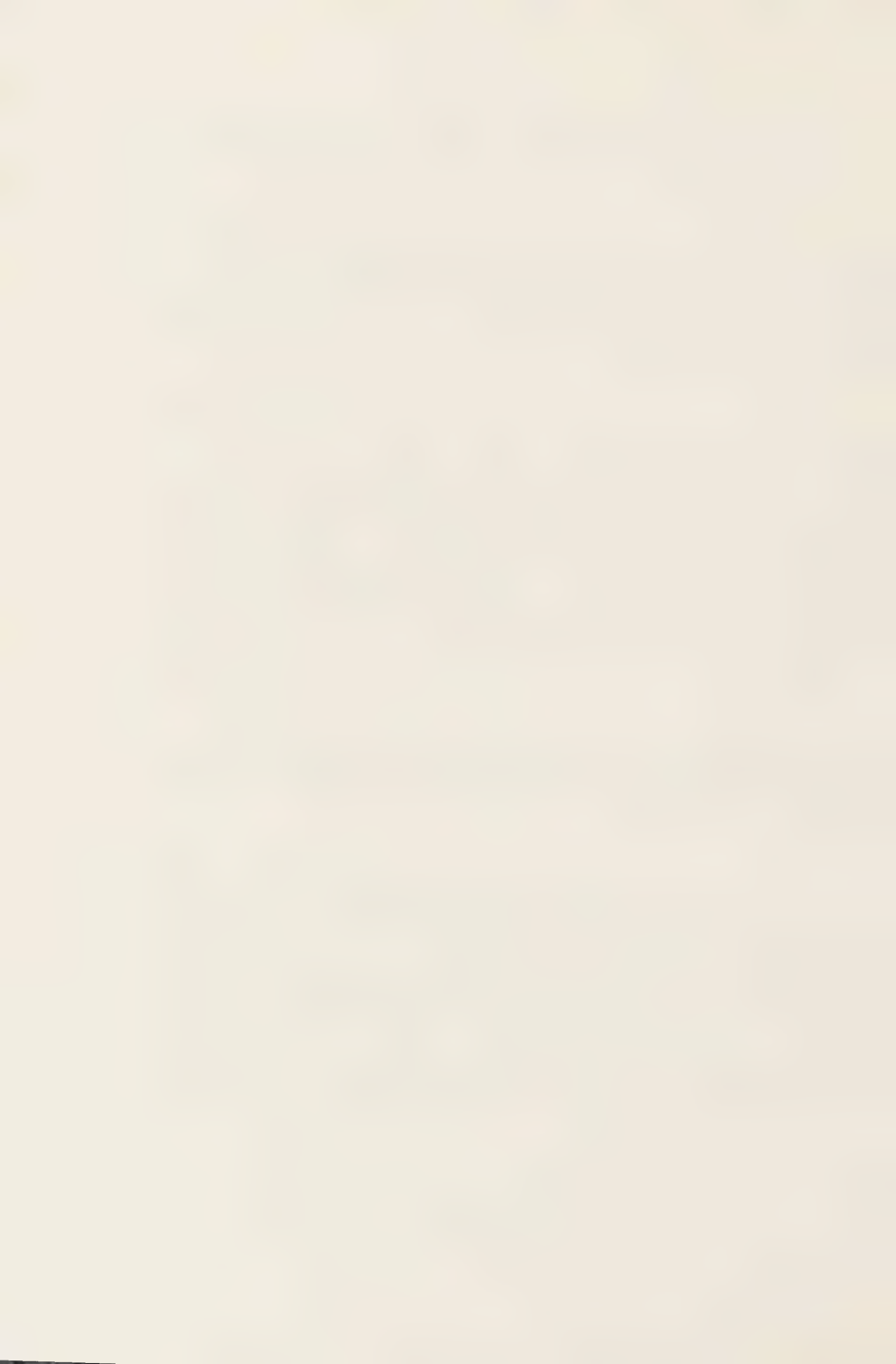
Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung und Sequenzanalyse des größten Bromcyanfragments der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, das aus 106 Aminosäuren besteht.

Die ersten 24 Positionen wurden durch automatische Sequenzierung des ganzen Peptids mit der Solid-Phase-Methode bestimmt. Zur Ermittlung der übrigen Positionen wurden die 12 tryptischen Spaltpeptide isoliert und ebenfalls überwiegend mit der Solid-Phase-Methode automatisch sequenziert. Die Reihenfolge der tryptischen Peptide wurde durch chymotryptische Überlappungspeptide festgelegt.

Mit der Sequenz des größten Bromcyanpeptids liegen rund 30 % der GDH-Untereinheit als zusammenhängendes Stück vor.

Beim Vergleich der Sequenz des Bromcyanpeptids mit der bekannten Sequenz der Lactat-Dehydrogenase finden sich Homologien im Bereich des essentiellen Histidin 195 der LDH sowie im Nicotinamid-Abschnitt der Coenzym-Bindungsdomäne. Diese Befunde gestatten eine Zuordnung des GDH-Fragments zur LDH-Sequenz und lassen eine Ähnlichkeit beider Enzyme im Sinne der Domänenhypothese erwarten.



F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Pette, D.
(1965) Naturwissenschaften 52 A, 597.
2. Houšťek, J., Cannon, B. & Lindberg, O.
(1975) Eur. J. Biochem. 54, 11-18.
3. White, H.B. & Kaplan, N.O.
(1972) J. Molec. Evolution 1, 158-172.
4. Bücher, Th. & Klingenberg, M.
(1958) Angew. Chem. 70, 552.
5. Embden, G., Deuticke, H.J. & Kraft, G.
(1932) Klin. Wochenschr. 12, 213.
Meyerhof, O. & Kiessling, W.
(1933) Bio.Z. 264, 40.
Embden, G. & Ickes, Th.
(1934) Z. Physiol. Chem. 230, 63.
6. Zebe, E., Delbrück, A. & Bücher, Th.
(1957) Angew. Chem. 69, 65.
7. Estabrook, R.W. & Sacktor, B.
(1958) J. Biol. Chem. 233, 1014.
8. Rossmann, M.G., Liljas, A., Brändén, C.-I.
& Banaszak, L.J.
(1975) in The Enzymes (Boyer, P.D., Hrsg.), Bd. 11,
61-102, Academic Press, New York.
9. Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J.
& Rossmann, M.G.
(1975) in (8), S. 191-292.
10. Davidson, B.E., Sajgo, M., Noller, H.F. & Harris, J.I.
(1967) Nature 216, 1181-1185.
11. Harris, J.I. & Perham, R.N.
(1968) Nature 219, 1025-1028.
12. Jones, G.M.T. & Harris, J.I.
(1972) FEBS Lett. 22, 185-189.
13. Jörnvall, H.
(1970) Eur. J. Biochem. 16, 41-49.
14. Jörnvall, H. & Markovič, O.
(1972) Eur. J. Biochem. 29, 167-174.
15. Jörnvall, H. & Pietruszko, R.
(1972) Eur. J. Biochem. 25, 283-290.
16. Moon, K., Piskiewicz, D. & Smith, E.L.
(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69, 1380.
17. Wootton, J.C., Chambers, G.K., Holder, A.A., Baron,
A.J., Taylor, J.G., Fincham, J.R.S., Blumenthal, K.M.,
Moon, K.E. & Smith, E.L.
(1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 71, 4361.

18. Taylor, S.S., Oxley, S.S., Allison, W.S. & Kaplan, N.O.
(1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 1790-1794.
19. Torff, H.-J. & Jaenicke, R.
(1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 284.
20. Banaszak, L.J. & Bradshaw, R.A.
(1975) in (8), S. 369-396.
21. Michel, R. & Neupert, W.
(1973) Eur. J. Biochem. 36, 53-57.
22. Otto, J., Raggi, A., Machleidt, W. & Bücher, Th.
(1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 332-344.
23. Gurd, F.R.N.
(1972) Methods Enzymol. 25, 424-438.
24. Habeeb, A.F.S.A.
(1972) Methods Enzymol. 25, 457-464.
25. Ellman, G.L.
(1959) Arch. Biochem. Biophys. 82, 70.
26. Cleland, W.W.
(1964) Biochemistry 3, 480-482.
27. Gross, E.
(1967) Methods Enzymol. 11, 238-255
28. Braunitzer, G., Schrank, B. & Ruhfus, A.
(1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351,
1589-1590.
29. Atassi, M.Z. & Habeeb, A.F.S.A.
(1972) Methods Enzymol. 25, 546-553.
30. Mitchell, W.M. & Harrington, W.F.
(1968) J. Biol. Chem. 243, 4683-4692.
31. Otto, J.
(1970) Dissertation, München.
32. Edelhoch, H.
(1967) Biochemistry 6, 1948-1954.
33. Bredderman, P.J.
(1974) Anal. Biochem. 61, 298-301.
34. Laursen, R.A.
(1971) Eur. J. Biochem. 20, 89-102.
35. Laursen, R.A.
(1975) in Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies
and Peptides (Weetall, H.H., Hrsg.) S. 576,
Marcel Dekker, New York.
36. Laursen, R.A., Bonner, A.G. & Horn, M.J.
(1975) in Instrumentation in Amino Acid Sequence
Analysis (Perham, R.N., Hrsg.), Academic Press,
New York, im Druck.

37. Edman, P.
(1970) in Protein Sequence Determination (Needleman, S.B., Hrsg.), S. 211-255, Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
38. Machleidt, W., Hofner, H. & Wachter, E.
(1975) in Solid-Phase Methods in Protein Sequence Analysis (Laurson, R.A., Hrsg.), S. 17-30, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.
39. Wachter, E., Hofner, H. & Machleidt, W.
(1975) in (38), S. 31-46.
40. Wachter, E., Machleidt, W., Hofner, H. & Otto, J.
(1973) FEBS Lett. 35, 97-102.
41. Ambler, R.P.
(1965) Biochem. J. 96, 32 P.
42. Horn, M.J. & Laurson, R.A.
(1973) FEBS Lett. 36, 285-288.
43. Kulbe, K.D.
(1974) Anal. Biochem. 59, 564-573.
44. Pisano, J.J.
(1972) Methods Enzymol. 25, 27-44.
45. Bober, H.
(1971) Beckman Report 1/71, 3-9.
46. Smithies, O., Gibson, D., Fanning, E.M., Goodfliesh, R.M., Gilman, J.G. & Ballantyne, D.L.
(1971) Biochemistry 10, 4912-4921.
47. Felix, A.M. & Jimenez, M.H.
(1974) J. Chromatog. 89, 361-364.
48. Vandekerckhove, J. & van Montagu, M.
(1974) Eur. J. Biochem. 44, 279-288.
49. Fales, H.M., Nagai, Y., Milne, W.A., Brewer, H.B. jr., Bronzert, T.J. & Pisano, J.J.
(1971) Analyt. Biochem. 43, 288
50. Gray, W.R.
(1972) Methods Enzymol. 25, 121-138.
51. Gray, W.R.
(1972) Methods Enzymol. 25, 333-344.
52. Machleidt, W., Wachter, E., Scheulen, M. & Otto, J.
(1973), FEBS Lett. 37, 217-220.
53. Pfeleiderer, G., Celliers, P.G., Stanulavic, M., Wachsmuth, E.D., Determann, H. & Braunitzer, G.
(1964) Biochem. Zeitschrift 340, 552
54. Drapeau, G.R., Boily, Y. & Houmard, J.
(1972) J. Biol. Chem. 247, 6720-6726.
55. Houmard, J. & Drapeau, G.R.
(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3506-3509.

56. Sugiyama, T., Suzuki, Y. & Takeuchi, T.
(1973) J. Chromatog. 77, 309-316.
57. Edman, P. & Begg, G.
(1967) Eur. J. Biochem. 1, 80-81.
58. Machleidt, W.
(1968) Dissertation, München.
59. Krejci, K. & Machleidt, W.
(1969) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 981-993.
60. Butler, P.J.G. & Hartley, B.S.
(1972) Methods Enzymol. 25, 191-199.
61. Machleidt, W., Kerner, W. & Otto, J.
(1970) Z. Anal. Chem. 252, 151-158.
62. Machleidt, W., Assfalg, I., Rückl, G. & Wachter, E.
(1975) in (38), S. 149-160.
63. Shotton, D.M. & Hartley, B.S.
(1970) Nature 225, 802-806.
64. Davies, D.R., Padlan, E.A. & Segal, D.M.
(1975) Annu. Rev. Biochem. 44, 639-667.
65. Wu, T.T., Fitch, W.M. & Margoliash, E.
(1974) Annu. Rev. Biochem. 43, 539-566.
66. Terhorst, C., Möller, W., Laursen, R.A. & Wittmann-Liebold, B.
(1973) Eur. J. Biochem. 34, 138-152.
67. Wittmann-Liebold, B. & Lehmann, A.
(1975) in (38), S. 81-90.
68. Adetugbo, K., Poskus, E., Svosti, J. & Milstein, C.
(1975) Eur. J. Biochem. 56, 503-519.
69. Schiltz, E. & Reinbolt, J.
(1975) Eur. J. Biochem. 56, 467-481.
70. Ramachandran, L.K. & Witkop, B.
(1967) Methods Enzymol. 11, 283-299.
71. Spande, T.F. & Witkop, B.
(1970) Advan. Prot. Chem. 24, 97-260.
72. Light, A.
(1967) Methods Enzymol. 11, 417-420.
73. Horn, M.J.
(1975) in (38), S. 51-60.
74. Apitz-Castro, R. & Suarez, Z.
(1970) Biochim. Biophys. Acta 198, 176-182.
75. Chou, P.Y. & Fasman, G.D.
(1974) Biochemistry 13, 222-244.

G. V E R Z E I C H N I S D E R A B K Ü R Z U N G E N

Enzyme

	Adenylatkinase	EC. 2.7.4.3
ADH	Alkohol-Dehydrogenase	EC. 1.1.1.1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	EC. 1.2.1.12
GDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase	EC. 1.1.1.8
GluDH	Glutamat-Dehydrogenase (NAD(P) ⁺)	EC. 1.4.1.3
	aus Rinder- und Hühnerleber	
	Glutamat-Dehydrogenase (NAD ⁺)	EC. 1.4.1.2
	aus Neurospora	
LDH	Lactat-Dehydrogenase	EC. 1.1.1.27
m-MDH	mitochondriale Malat-Dehydrogenase	EC. 1.1.1.37
s-MDH	cytosolische Malat-Dehydrogenase	EC. 1.1.1.37
	Phosphoglyceratkinase	EC. 2.7.2.3
TIM	Triosephosphat-Isomerase	EC. 5.3.1.1
AHC	Ammoniumhydrogencarbonat	
AMP	Adenosinmonophosphat	
APG	3-Aminopropyl-Glas	
CI	chemische Ionisation	
CM	Carboxymethyl-	
CPG	Controlled-Pore Glass	
Dansyl	Dimethylaminonaphthalinsulfonsäure-	
DITC	p-Phenylendiisothiocyanat	
DMF	Dimethylformamid	
DTE	1,4-Dithioerythrit	
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)	
FID	Flammenionisations-Detektor	
FPD	schwefelspezifischer flammenphotometrischer Detektor	
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid	

PTH	3-Phenyl-2-thiohydantoin
QAE	Triäthyl-2-hydroxypropyl-ammonium-
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TÄA	Triäthylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TLCK	N-Tosyl-L-Lysin-chlormethyl-ke-ton
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanin-chlormethyl-ke-ton
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

L e b e n s l a u f

Am 1.12.1946 wurde ich als zweite von 3 Töchtern des Hafnermeisters Robert Assfalg und seiner Ehefrau Paula, geb. Berger, in Tettnang geboren.
1961 starb mein Vater.

Im Frühjahr 1966 legte ich am Mädchengymnasium Ravensburg die Reifeprüfung ab. Nach 2-jährigem Praktikum bei Herrn Apotheker Kremer in der Kloster-Apotheke Weingarten absolvierte ich am 18.3.1968 in Stuttgart die pharmazeutische Vorprüfung. Im Mai 1968 begann ich das Pharmaziestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München, das ich am 7.5.1971 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit Januar 1972 bearbeite ich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München im Rahmen einer Doktorarbeit einen Teilaspekt der Primärstrukturaufklärung der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel.

